

**POHJOISEN ITÄMEREN VAPAANA ELÄVIEN  
RAKKOHAURUPOPULAATIOIDEN ALKUPERÄ JA  
LISÄÄNTYMINEN**

Anne Aittamäki

Pro gradu -tutkielma

Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta

Akvaattiset tieteet

Helsingin yliopisto

Toukokuu 2020

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Bio- ja ympäristötieteellinen		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree Programme Akvaattisten tieteiden koulutusohjelma	
Tekijä – Författare – Author Anne Aittamäki			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Pohjoisen Itämeren vapaana elävien rakkohaurupopulaatioiden alkuperä ja lisääntyminen			
Oppiaine/Opintosuunta – Läroämne/Studieinriktning – Subject/Study track Akvaattiset tieteet			
Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu -tutkielma		Aika – Datum – Month and year Toukokuu 2020	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 50 + liitteet
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>Rakkohauru (<i>Fucus vesiculosus</i>) on ruskeisiin leviin kuuluva makrolevä, joka kasvaa Atlantin valtameressä laajalla alueella Grönlannista Portugaliin asti. Rakkohauru on valtamerissä vuorovesivyyhykkeen laji, joka sietää laajaa suolaisuuden ja lämpötilan vaihtelua. Itämeressä rakkohauru kasvaa kilpailun vähäisyyden vuoksi sublitoraalissa vyyhykkeessä jopa kymmenen metrin syvyyteen asti ja on tärkeä elinympäristöjä muodostava laji.</p> <p>Rakkohaurua pidetään useimmiten kovien pohjien lajina, joka kiinnittyy alustaansa tyvilevyn avulla. Rakkohaurusta tunnetaan kuitenkin myös toinen tyyppi, joka elää pehmeillä hiekkapohjilla tai suistoalueilla eikä ole kiinnittynyt tyvilevyllä pohjaan. Tässä työssä selvitettiin, ovatko kiinnittyneet ja vapaana elävät rakkohaurut geneettisesti erilaisia, mistä vapaana kasvavat yksilöt ovat peräisin ja voivatko ne lisääntyä itsenäisesti.</p> <p>Suomen ja Ruotsin rannikoilta kerättiin kymmenestä eri paikasta sekä vapaana kasvavia että kiinnittyneitä rakkohaurunäytteitä, joita verrattiin toisiinsa. Keräyspaikat sijaitsivat yhden, muutaman tai satojen kilometrien päässä toisistaan. Kerätystä näytteistä eristettiin viisi DNA-mikrosatelliittimarkkeria, joiden perusteella tehtiin geneettiset analyysit.</p> <p>Tutkimustuloksista selvisi, että Suomen ja Ruotsin rakkohaurupopulaatioiden välillä ei ollut tilastollisesti merkittävää geneettistä eroa eivätkä populaatioiden väliset geneettiset erot riippuneet niiden välisestä etäisyydestä. Niinpä kysymykseen siitä, mistä vapaana kasvavat populaatiot ovat lähtöisin, ei saatu vastausta. Sen sijaan vapaana kasvavat ja kiinnittyneet rakkohaurun muodot erosivat toisistaan geneettisesti. Tämä viittaa siihen, että vapaana kasvavat populaatiot lisääntyvät ainakin osittain itsenäisesti. On mahdollista, että tämä johtaa ajan kuluessa vapaana kasvavien ja kiinnittyneiden rakkohaurun muotojen kehittymiseen omiksi lajeikseen, mutta tällä hetkellä se ei vaikuta kovin todennäköiseltä. Koska tutkitut populaatiot olivat pieniä ja käytettyjen mikrosatelliittien määrä vähäinen, lisätutkimukset ovat tarpeen tulosten luotettavuuden varmistamiseksi.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Rakkohauru, <i>Fucus vesiculosus</i> , DNA-mikrosatelliitti, vapaana kasvava, kiinnittynyt			
Ohjaaja tai ohjaajat –Handledare – Supervisor or supervisors Jaanika Blomster, Elina Leskinen, Perttu Seppä			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited e-thesis			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

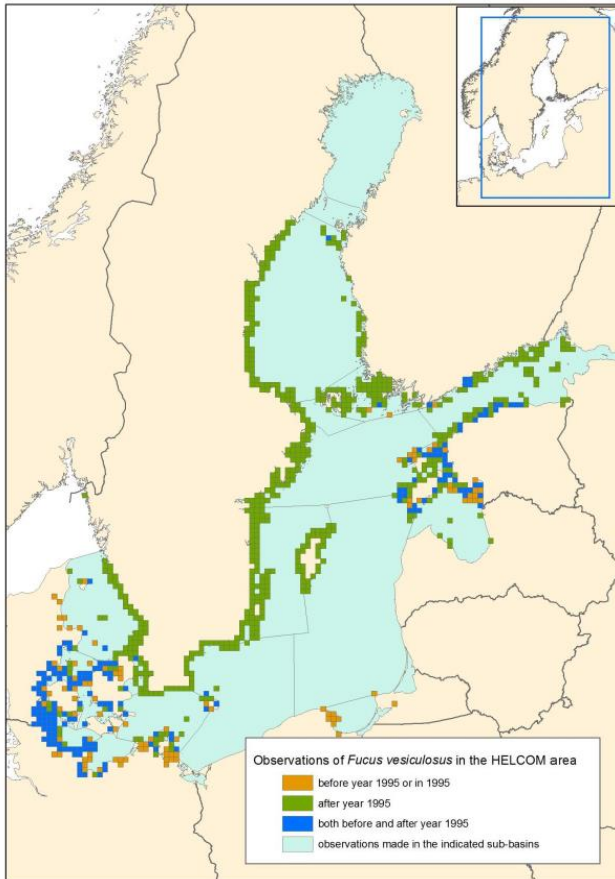
# Sisällysluettelo

1. Johdanto	4
1.1. DNA-mikrosatelliitit	10
1.2. Työn tarkoitus	12
2. Materiaalit ja menetelmät	13
2.1. Näytteenotto	13
2.2. Laboratorioanalyysit	18
2.2.1. Näytteiden käsittely	18
2.2.2. DNA:n eristäminen	18
2.2.3. Polymeraasiketjureaktio (PCR)	19
2.2.4. Genotyypaus	22
2.3. Aineiston analysointi	23
3. Tulokset	28
4. Tulosten tarkastelu	33
4.1. Ruotsin ja Suomen väliset erot	33
4.2. Vapaana kasvavien ja kiinnittyneiden populaatioiden väliset erot	34
4.3. Muita tutkimuksessa ilmi tulleita asioita	38
4.4. Johtopäätökset	40
5. Kiitokset	41
6. Lähteet	42
7. Liitteet	51
Liite 1: PCR-liuoksen optimointi	52
Liite 2. Yleistietoa populaatioista	63
Liite 3. Alleelien lukumäärä lokuksittain	67
Liite 4. Lokus- ja populaatiokohtaiset P-arvot Hardy-Weinbergin analyysissä	68

## 1. Johdanto

Rakkohauru (*Fucus vesiculosus*) kuuluu ruskoleviin (Phaeophyceae), jotka ovat eräs stramenopiilien (engl. stramenopiles) luokka. Kaikki tunnetut ruskolevälajit ovat monisoluisia ja osalla on sekovarressaan erikoistuneita rakenteita, jotka muistuttavat kasvien juuria, vartta ja lehtiä. DNA-todisteiden mukaan morfologiset samankaltaisuudet ovat kuitenkin kehittyneet kasvi- ja levälinjoissa erikseen kehittyneitä analogisia rakenteita eivätkä ole todiste lähisukulaisuudesta (Campbell ym. 2008). Ruskolevät ovat saaneet nimensä ruskeasta ja oliivinvihreästä väristään, joka johtuu viherhiukkasten yhteyttämiskalvostojen apupigmenteistä, kuten fukoksantiinista ja muista ksantofylleistä (Campbell ym. 2008, Rikkinen 1999). Suurin osa ruskolevistä elää merissä, ja ne ovat erityisen yleisiä lauhkeilla vyöhykkeillä, missä meriveden lämpötila on 10–15 °C (Campbell ym. 2008, Lüning 1990). *Fucus*-suvun leviä elää vain pohjoisella pallonpuoliskolla (Lüning 1990).

*Fucus*-suvun levillä on kaasurakkuloita, joiden avulla ne pysyvät pystyssä merenpohjassa ja liikkuvat veden mukana (Lüning 1990). Avoimilla rannoilla kasvavilta rakkohauruilta kaasurakkulat puuttuvat usein, sillä ne lisäävät veden liikkeen aiheuttamaa vastusta ja mekaanista stressiä (Lüning 1990, Norton ym. 1982). Rakkohaurua pidetään useimmiten kovien pohjien lajina, joka kiinnittyy alustansa tyvilevyn avulla (Torn ym. 2006). Rakkohauru on kuitenkin aiemmin jaettu jopa 24 eri muotoon, joista osa elää vapaina pohjalla (Kjellman 1890). Nykyäänkin tunnetaan erikoistunut rakkohaurun muoto, joka elää pehmeillä pohjilla tai suistoalueilla eikä ole kiinnittynyt tyvilevyllä pohjaan (HELCOM Red List Macrophyte Expert Group 2013, Lüning 1990). Itämeressä tätä muotoa on havaittu esimerkiksi Saksan ja Puolan rannikoilla, sekä Ruotsin itärannikolla ja Suomen lounaisrannikoilla suojaisissa sedimenttipohjaisissa lahdissa (HELCOM Red List Macrophyte Expert Group 2013). Askön alueella Ruotsissa sekä läntisellä Suomenlahdella havaitut vapaana kasvavat populaatiot ovat esiintyneet samoilla kasvupaikoilla jo ainakin 20 vuotta (Munsterhjelm 1997; Norberg 1995). Nämä vapaana kasvavat populaatiot kehittyvät hiekkapohjille, kun pohjaa peittävä muu kasvusto, esimerkiksi putkilokasvit, vähenee (Ellen Schagerström, henkilökohtainen tiedonanto).



Kuva 1. Rakkohauruhavainnot Itämerellä (HELCOM Red List Macrophyte Expert Group 2013). Rakkohauruhavaintoja on tehty ruskealla, vihreällä ja tummansinisellä merkityissä paikoissa. Ruskea väri kuvaa alueita, joilla rakkohaurua on havaittu vuonna 1995 tai ennen sitä. Vihreä väri kuvaa alueita, joilla rakkohaurua on esiintynyt vuoden 1995 jälkeen. Tummansinisellä merkityillä alueilla rakkohaurua on havaittu sekä ennen vuotta 1995 että sen jälkeen. Tässä kuvassa näkyvät sekä kiinnittyneet että vapaana kasvavat rakkohaurut.

Rakkohaurun koko ja ulkonäkö vaihtelee runsaasti riippuen siitä, onko kyseessä vapaana elävä vai kiinnittynyt muoto. Kiinnittyneet rakkohaurut voivat olla useita kymmeniä senttejä korkeita ja niillä on tyvilevy, jonka avulla ne ankkuroituvat kiinni kovaan pohjaan (Ruuskanen ym. 1999). Rakkohaurun ulkonäkö vaihtelee myös kasvupaikan mukaan. Paikoissa, joissa rakkohaurukasvusto altistuu voimakkaalle aallokolle, levien sekovarsien haarat ovat kapeampia kuin suojaisissa kasvupaikoissa (Ruuskanen ym. 1999). Myös vapaana elävien populaatioiden morfologia vaihtelee runsaasti: kiinnittyneitä yksilöitä muistuttavista kukkakaalimaisiin sekä kapeisiin ja pieniin nauhamaisiin muotoihin (Svedelius 1901, Waern 1952, Luther 1981). Tällä hetkellä ei tiedetä, johtuuko rakkohaurun morfologinen vaihtelu elinympäristön eroista vai aiheuttavatko sen geneettiset tekijät tai molemmat yhdessä.

Rakkohaurun ikää ei voi laskea sen haarojen lukumäärästä, sillä rakkohauru kasvattaa vuodessa useamman haaran ja aikuisella rakkohaurulla voi olla yli kymmenen haaraa (Bäck 1993).



Kuva 2. Vapaana elävä rakkohauru (Kuva: Jaanika Blomster).



Kuva 3. Kiinnittynyt rakkohaurukasvusto. (Kuva: Luontoportti.fi/Itämeri/ Metsähallitus, Sanna Saari).

Rakkohauru elää useita vuosia, ja se lisääntyy ensimmäisen kerran vasta kolmantena elinvuotenaan (Kautsky ym. 1992). Rakkohauru on kaksikotinen, eli uros- ja naarasgameetit muodostuvat eri yksilöissä. Reseptaakkelit (sekovarren kärjessä oleva rakkohaurun osa, jossa sukusolut kehittyvät) muodostuvat jo syyskuussa, mutta vaativat pimeän jakson (yön pituus vähintään 12 h) kehittyäkseen sukukypsiksi (Bäck ym. 1991). Hedelmöittämisessä naaras- ja

koiraspuoliset rakkohaurut vapauttavat gameetit vesipatsaaseen. Tämä tapahtuu useimmiten valoisalla ja tyynellä säällä hedelmöittymisen varmistamiseksi (Muhlin ym. 2011). Lisääntyminen tapahtuu kesä-heinäkuussa tai syys-lokakuussa populaatiosta riippuen (Bäck ym. 1991). Campbell ym. (2008) mukaan ruskolevät voivat lisääntyä sekä suvullisesti että suvuttomasti (klonaalisesti). Malm & Kautsky (2003) havaitsivat, että mikäli rakkohauruysilö katkaistaan, mutta tyvilevy jää jäljelle, tyvilevystä voi kasvaa uusi yksilö. Malm & Kautsky (2003) eivät havainneet sahalevällä (*Fucus serratus*) samankaltaista uusiutumiskykyä; sen sijaan kaikki tutkimuksessa käytetyt sahalevän tyvilevyt kuolivat tutkimuksen aikana. Lee (1989) havaitsi Tatarenkov ym. (2005) mukaan että rakkohaurusta irronneet adventiivihaarat (engl. adventitious branches) voivat jatkaa kasvamista vapaasti elävinä yksilöinä. Adventiivielimet (engl. adventitious organs), tässä tapauksessa haarat, ovat kasvien elimiä, jotka kehittyvät myöhäissyntyisesti epänormaaliin paikkaan (Tirri ym. 2001). Tatarenkov ym. (2005) ja Bergström ym. (2005) havaitsivat että irronneet adventiivihaarat voivat kiinnittyä pohjaan ja kasvaa uusiksi kiinnittyneiksi yksilöiksi. Rakkohaurun (*Fucus vesiculosus*) lisäksi myös itämerenaurun (*Fucus radicans*) irronneet adventiivihaarat pystyvät kiinnittymään pohjaan ja kehittymään täysikasvuisiksi leväyksilöiksi. Ei kuitenkaan ole tutkittu, pystyvätkö nämä yksilöt vielä lisääntymään (Tatarenkov ym. 2005).

Rakkohauru sietää lämpötilan ja suolaisuuden runsasta vaihtelua ja kasvaakin Itä-Atlantilla Grönlannin eteläpuolelta ja Vienanmereltä Portugaliin asti. Tyyneltämereltä rakkohaurua ei ole havaittu. Atlantilla rakkohauru kasvaa useimmiten vuorovesivyöhykkeessä, mutta Itämeressä laji elää sublitoraalissa vyöhykkeessä kokonaan upoksissa (Lüning 1990). Rakko- ja itämerenauru ovat ainoat Itämeressä elävät suuret, rakenteellisesti tärkeät levät lukuun ottamatta sahalevää (*F. serratus*), joka elää vain Itämeren eteläosissa (Kautsky ym. 1992, Bergström ym. 2005). Rakkohauru on avainlaji Itämeren alueella ja muodostaa monimuotoisia yhteisöjä (Kautsky ym. 1992). Monet kalalajit kutevat rakkohaurun sekaan (Aneer ym. 1983) ja rakkohaurun tihein kasvuvyöhyke tarjoaa elinympäristöjä, piilopaikkoja ja ravintoa mm. selkärangattomille, kaloille ja epifyyteilte (Kautsky ym. 1992). Rakkohaurun seassa onkin havaittu elävän jopa 30 eri lajia (Kautsky ym. 1992). Rakkohauru muodostaa elinympäristöjä 0,5–5 metrin syvyydellä pohjassa (Ruuskanen ym. 1999). Rakkohauru kasvaa myös tätä syvemmällä, Itämeren keskiosissa paikoin jopa yli kymmenen metrin syvyydessä (Kautsky ym. 1992). Yleisesti ottaen rakkohauru kasvaa pohjoisella ja keskisellä Itämerellä

syvemmällä kuin Itämeren suulla Tanskan salmissa (Torn 2006). Tämä johtuu suurimmaksi osaksi siitä, että kilpailevat makrolevät eivät kestä Itämeren vähäsuolaisuutta. Myös muilla ympäristötekijöillä, kuten jäätymisellä ja keväisillä matalan vedenkorkeuden ajanjaksoilla, on vaikutusta (Kautsky ym. 1992). Suolaisemmilla merialueilla, kuten Atlantilla, rakkohauru kasvaa hyvin kapealla alueella vuorovesivyohykkeessä (Lüning 1990). Parhaat olosuhteet Itämeren rakkohaurulle ovat keskimääräisessä vedensyvyydessä pinnan ja rakkohaurun suurimman mahdollisen kasvusyvyiden välillä (Torn ym. 2006). Rakkohaurun tihein kasvusto on lähes kaikkialla Itämeressä samalla syvyydellä, n. 1–2 metrissä, huolimatta suurimman mahdollisen kasvusyvyiden ja rakkohauruvyön syvyysrajan alueellisesta vaihtelusta. Tällaisissa olosuhteissa rakkohauru ei altistu mm. jäätymiselle, mutta valoa on riittävästi, jotta kasvu on mahdollisimman tehokasta. Rakkohauru luokitellaan koko esiintymisalueellaan elinvoimaiseksi (HELCOM Red List Macrophyte Expert Group 2013).

Rakkohaurun kasvusyvyys on madaltunut lähes kaikkialla Itämeressä 1900-luvun alusta nykypäivään. Suurin osa laskusta on tapahtunut jo 1970–80 -luvuilla tai aiemmin (Kangas ym. 1982, Vogt ym. 1991), ja tällä hetkellä on havaittavissa vain alueellisia muutoksia (Torn ym. 2006). Nilsson ym. (2004) havaitsivat Blekingen ja Kalmarin alueilla tekemässään tutkimuksessa, että rakkohauru oli jossain määrin palannut suojaisille kasvupaikoille. Rakkohaurun tilanne Itämeressä on silti edelleen huono, ja esimerkiksi Ruuskanen (2016) havaitsi rakkohaurun taantuneen voimakkaasti Inkoossa ja Tvärminnessä vuoden 2007 jälkeen. Todennäköisin syy kasvusyvyiden madaltumiseen on rehevöityminen, jonka vuoksi epifyytit ja plankton lisääntyvät ja vähentävät saatavilla olevan valon määrää, joko kellumalla vedessä tai kasvamalla rakkohaurun päälle (Eriksson ym. 1998, Torn ym. 2006). Larsson ym. (1985) arvioivat, että fosforipäästöt Itämereen kasvoivat kahdeksan- ja typpipäästöt nelinkertaisiksi 1900-luvun alusta 1980-luvulle. Lisäksi Sandén & Håkansson (1996) mittasivat Secchi-syvyyden vähentyneen 5 cm/vuosi vuosina 1919–39 ja vuosina 1969–91. Koko ajanjaksolla 1919–1991 tämä tarkoittaa, että Secchi-syvyys on vähentynyt 3,6 metriä. Vaikka valon määrä ja rakkohaurun kasvusyvyys ovat Itämeren suulla miltei riippumattomia toisistaan ja valaistusolosuhteet selittävät keski- ja sisemmässä Itämeressäkin rakkohaurun keskimääräisestä kasvusyvyydestä vain 16 %, asialla on silti vaikutusta (Torn ym. 2006). Valon määrä selittää nimittäin 85 % variaatiosta rakkohaurun syvyysrajassa, eli suurimmassa mahdollisessa kasvusyvyudessa. Lisäksi rakkohauru muiden kasvua rajoittavien tekijöiden



vuoksi harvoin kasvaa valon määrittämällä syvyysrajalla asti. Myös orgaaninen sedimentti, joka saattaa peittää pohjan ja heikentää rakkohaurun tsygootin mahdollisuuksia kiinnittyä, lisääntyy rehevöitymisen myötä. Samoin rakkohaurua syövät leväsiirat lisääntyvät rehevöitymisen seurauksena, mahdollisesti koska leväsiiran poikaset käyttävät pääravintonaan lisääntyneitä epifyyttejä (Torn ym. 2006).

Rehevöitymisen lisäksi toinen Itämeressä 1900-luvulla tapahtunut laaja-alainen ympäristömuutos on pintaveden suolapitoisuuden lisääntyminen noin 0,5–0,9 ‰ (Matthäus, 1977). Rakkohauru kasvaa matalassa suolapitoisuudessa syvemmällä, ja suolapitoisuus selittää Tornin (2006) mukaan noin 50 % rakkohaurun kasvusyvyyydestä. Syynä on kuitenkin kilpailun puute eikä suolaisuuden vaikutus rakkohauruun sinänsä. Tämän vuoksi suolapitoisuuden lisääntymisen vaikutus rakkohaurun kasvusyvyyteen on todennäköisesti melko mitätön, sillä rakkohaurun kasvusyvyys on todettu vähenevän vain 0,14 metriä kun veden suolapitoisuus kasvaa 1 psu:lla (Torn 2006). Hällfors ym. (1984) uskoivat kuitenkin, että suolapulsseilla saattaisi olla haitallisia vaikutuksia rakkohauruun, sillä kohonnut suolapitoisuus ja pulssien merenpohjasta nostamat ravinteet suosivat sinilevien, rihmalevien ja leväsiirtojen kaltaisia lajeja, joista puolestaan on haittaa rakkohaurulle. Tästä on myös todisteita, sillä Kiirikki (1996) havaitsi, että rakkohaurun määrä väheni Itämeressä vuoden 1993 suolapulssin seurauksena. Suolapulssien yleisyys ja voimakkuus ovat kuitenkin laskeneet viime vuosikymmenten aikana. Vuosien 1983 ja 1993 välillä ei esiintynyt lainkaan suolapulsseja (Lass & Matthäus, 1996), ja vuosien 1993 ja 2014 välillä esiintyi vain pieniä suolapulsseja (Matthäus ym. 2008).

Tulevaisuudessa tilanne saattaa kääntyä päinvastaiseksi, sillä Itämeren suolapitoisuuden on ennustettu laskevan ilmastonmuutoksen ja siitä seuraavan lisääntyneen sadannan ja maa-alueilta tulevan valunnan vuoksi (HELCOM 2013). Suolapitoisuuden voimakas lasku saattaa olla haitallista rakkohaurulle, sillä suolapitoisuus on rakkohaurun kasvua rajoittava tekijä, ja rakkohaurun sietoraja suolapitoisuuden suhteen on 3–4 psu (Kautsky ym. 1992). Torn (2006) uskoi rakkohaurun siirtyvän kasvamaan syvemmälle suolaisempaan veteen kun lähestytään rakkohaurun suolapitoisuuden sietorajaa. Lisäksi Takolander ym. (2017) havaitsivat, että veden lämpeneminen yhdessä suolapitoisuuden laskun kanssa on haitallista rakkohaurulle ja heikentää sen kasvua.

Muita mahdollisia syitä populaatiokoon pienenemiseen ovat kilpailu elintilasta sinisimpukoiden ja muiden makrolevien kanssa (Torn ym. 2006, Kiirikki 1996). Myös ympäristömyrkyillä saattaa olla vaikutusta rakkohaurun vähenemiseen (Kautsky ym. 1988). Elintilasta käytävä kilpailu saattaa olla ainakin osaksi sidoksissa rehevöitymiseen, sillä Itämeren rehevöityessä ja valaistusolosuhteiden heiketessä rakkohaurun rehevin vyöhyke siirtyy lähemmäs pintaa ja sinisimpukoiden ja meriahdinparran kaltaiset lajit, jotka voivat kasvaa heikommassa valaistuksessa, valtaavat rakkohaurun jälkeensä jättämän tyhjän tilan (Torn ym. 2006). Vaikka rehevyys myöhemmin vähenisi ja valaistusolosuhteet paranisivat, rakkohauru ei voi enää vallata takaisin entisiä kasvualueitaan. Rakkohaurun kasvusyvyyden siirtymisellä lähemmäs pintaa saattaa olla lajille muitakin haitallisia seurauksia kuin se, että muut lajit valtaavat syvemmällä olevat alueet. Matalammassa kasvusyvyydessä rakkohauru on alttiina jääpeitteen ja aaltoliikkeen aiheuttamalle kulutukselle, mikä saattaa hävittää rakkohaurun laajalta alueelta (Eriksson ym. 1998). Lisäksi *F. vesiculosuksen* kasvualueen kaventuessa rantavyöhykkeessä laji muuttuu alttiimmaksi paikalliselle sukupuutolle, kun perusta sekä seksuaaliselle että aseksuaaliselle lisääntymiselle pienenee (Torn ym. 2006). Niinpä rakkohaurun väheneminen saattaa olla itseään kiihdyttävä prosessi.

### **1.1. DNA-mikrosatelliitit**

Genotyypauksessa ei yleensä selvitetä eliön koko genomia, eikä niin tehty tässäkään tutkimuksessa, vaan monistettiin alukkeiden avulla tietyt DNA-sekvenssit, joiden DNA-mikrosatelliitteja verrattiin toisiinsa. Alukkeet ovat pieniä DNA-pätkiä, pituudeltaan keskimäärin noin 20 nukleotidia, joita käytetään monistettaessa DNA:ta PCR:ssä (Prescott ym. 2002).

DNA:ssa on paljon emästen toistojaksoja, jotka jaetaan kokonsa perusteella mikro-, mini- ja tavallisiin satelliitteihin (Tautz 1993). Toistojaksoja esiintyy sekä tuman että soluelinten DNA:ssa (Dong ym. 2013). DNA-mikrosatelliitit ovat DNA:ssa esiintyviä toistojaksoja, joiden pituus vaihtelee tavallisesti yhdestä viiteen emäkseen (Jarne & Lagoda 1996). Weberin (1990) mukaan DNA-mikrosatelliitit voidaan jakaa kolmeen ryhmään (taulukko 1):

1. Puhtaisiin toistojaksoihin, joissa ei ole keskeytyksiä
2. Epätäydellisiin toistojaksoihin, joissa toistojakso keskeytyy kerran tai useammin.
3. Yhdistelmäjaksoihin, joissa on useita erilaisia toistojaksoja

Taulukko 1. DNA-mikrosatelliittien kolme eri ryhmää: puhtaat ja epätäydelliset toistojaksot sekä yhdistelmäjakso. Puhtaissa toistojaksoissa ei ole muita emäksiä kuin ne, jotka toistuvat, kun taas epätäydellisissä toistojaksoissa on välissä yksi tai useampi emäs, joka ei toistu. Yhdistelmäjaksoissa on kaksi useampia erilaisia toistuvia emäksiä tai niiden yhdistelmiä. Yhdistelmäjakso voi olla joko puhtaita tai epätäydellisiä (Weber 1990).

Ryhmä	Esimerkki
Puhdas toistojakso	CACACACACACACA
Epätäydellinen toistojakso	CACACATTCACACATTCA
Puhdas yhdistelmäjakso	CACACACACAGTGTGTGTGT
Epätäydellinen yhdistelmäjakso	CACAGGCACAGTGTGTAAAGT

DNA-mikrosatelliitit ovat hyödyllisiä työkaluja genetiikan tutkimuksessa, sillä niitä esiintyy kaikkien eukaryoottien DNA:ssa ja niitä on suhteellisen helppo analysoida (Jeffreys ja Pena 1993). Ne mutatoituvat nopeasti ja yleisin mutaatio on toistojaksojen erilainen määrä eri yksilöillä (Tóth ym. 2000, Dong ym. 2013). DNA-mikrosatelliitit ovat polymorfisia, neutraaleja ja kodominoivia (Jarne & Lagoda 1996). Myös niiden lyhyys on hyödyllistä geneettisen analyysin kannalta, sillä siitä on hyötyä epätäydellisistä DNA:ta tutkittaessa (Jeffreys & Pena 1993). DNA-mikrosatelliitteja voidaan käyttää esim. tunnistamaan yksilön vanhemmat (Webster & Reichart 2005).

DNA-mikrosatelliitit eivät ole virheettömiä, ja hyvinkin pieni virheaste voi johtaa merkittävästi vääristyneeseen lopputulokseen. Mikäli käytettävä DNA on heikkolaatuista tai sitä on vähän, monistus saattaa olla epäluotettavaa, jolloin toinen alleeli ei välttämättä monistu. Tällöin heterotsygootti yksilö vaikuttaa siltä kuin sillä olisi vain yksi alleeli (allelic dropout, allelipudotus). On myös mahdollista, että monistustuotteet vaikuttavat oikeilta alleeleilta (Hoffman & Amos 2005).

## 1.2. Työn tarkoitus

Työn tarkoituksena oli oppia ymmärtämään paremmin pohjoisen Itämeren vapaana elävien rakkohaurupopulaatioiden rakennetta ja lisääntymistä. Vaikka pehmeiden pohjien rakkohaurupopulaatiot ovat hyvin dokumentoituja ja niiden olemassaolosta on tiedetty jo kauan (Kjellman 1890), niiden alkuperä on edelleen tuntematon. Tässä tutkimuksessa oli kolme tärkeää tutkimuskysymystä:

- 1) Ovatko pehmeiden pohjien rakkohaurupopulaatiot lähtöisin lähialueilta vai kauempaa?
- 2) Onko niiden olemassaolo riippuvaista kiinnittyneistä populaatioista?
- 3) Kykenevätkö ne kokonaan tai osittain ylläpitämään itseään suvuttoman tai suvullisen lisääntymisen avulla?

Tutkimuksessa käytetyt populaatiot olivat peräisin Ruotsista ja Suomesta. Tutkimuksessa käytettiin DNA-mikrosatelliitteihin (neutraalit markkerit) perustuvaa populaatiogeneettistä analyysiä geneettisen variaation tutkimiseksi kiinnittyneiden ja vapaana elävien populaatioiden välillä ja sisällä. Molekyylianalyysit suoritettiin Viikin kampuksen Molekyyliökologian ja systematiikan laboratoriossa Helsingin yliopistossa. DNA-mikrosatelliitteja käytettiin kloonien identifioimiseksi, jotta saatiin selville olivatko vapaana elävät rakkohaurupopulaatiot geneettisesti erilaisia ja olivatko ne peräisin paikallisista vai kauempana olevista populaatioista.

## 2. Materiaalit ja menetelmät

Ruotsin itärannikolta kerättiin kolmesta eri paikasta sekä vapaana kasvaneita että kiinnittyneitä rakkohaurunäytteitä, ja lisäksi kolmesta paikasta kerättiin vain kiinnittyneitä näytteitä (taulukko 2). Suomen länsirannikolta kerättiin kolmesta eri paikasta kiinnittyneitä ja yhdestä paikasta vapaana kasvavia rakkohauruja (taulukko 2). Merkkigeenien avulla tutkittiin erilaistumista sellaisten rakkohaurupopulaatioiden välillä, jotka kasvoivat yhden, muutaman tai satojen kilometrien etäisyydellä toisistaan (kuva 4).



Kuva 4. Rakkohaurunäytteitä kerättiin yhteensä kymmenestä paikasta (kuusi paikkaa Ruotsissa ja neljä Suomessa), ja niiden geenejä verrattiin sellaisten populaatioiden geeneihin, jotka olivat peräisin yhden, muutaman tai satojen kilometrien päästä.

### 2.1. Näytteenotto

Tutkimusta varten näytteitä kerättiin sukeltamalla Trosan saaristoalueelta Tukholman eteläpuolelta Ruotsista sekä Tvärminnen saaristosta Suomen etelärannikolta ja Olkiluodosta Suomen lounaisrannikolta (kuvat 5, 6 ja 7 taulukko 2). Alkuperäisen tutkimussuunnitelman mukaan kaikista näytteenottopaikoista oli tarkoitus saada 20 kiinnittynyttä ja 20 vapaana kasvanutta yksilöä. Tämä ei kuitenkaan toteutunut, vaan eri näytteenottopaikoista saatiin hyvin eri määriä näytteitä. Kaikista Ruotsin paikoista kerättiin 20 näytettä, kun taas Suomen

keräyspaikoista saatiin vain muutama näyte kustakin. Vapaana kasvavia yksilöitä löydettiin Suomesta vain Olkiluodosta, kun taas Ruotsista niitä löytyi Gälönistä, Arnöstä ja Stenskäristä (taulukko 2). Kaikkialta paitsi Olkiluodosta kerättiin kiinnittyneitä rakkohauruyskilöitä. Yhdessä näytteessä oli yksi sekovarsi, jonka koko vaihteli suuresti. Tavallinen, kiinnittynyt rakkohauru kasvoi jopa n. 50 cm korkeaksi, kun taas Olkiluodon näytteet olivat kääpiömuotoista vapaana elävää rakkohaurua, jonka sekovarsi oli alle 10 cm korkea. Rakkohaurunäytteitä oli yhteensä 192 kappaletta, joista 62 oli vapaana kasvaneita ja 130 kiinnittyneitä (taulukko 2).

Ruotsin näytteenottopaikat sijaitsivat joko Trosan saariston keskivaiheilla tai sisäsaaristossa (kuva 5). Paikat olivat suojaisia ja syvyydeltään 2–4 metriä. Myöskään voimakkaita virtauksia ei ollut, mutta kaikissa näytteenottopaikoissa veden vaihtuvuus oli hyvä. Kaikissa Ruotsin näytteenottopaikoissa oli pehmeä pohja, jossa kasvoi sekä rakkohaurua että putkilokasveja.

Suomesta kerättiin näytteitä neljästä eri paikasta: Spikarnasta, Rovholmarnasta ja Kummelskäristä, jotka sijaitsivat Tvärminnen saaristossa, sekä Olkiluodosta. Spikarna oli noin 2–3 metriä syvä laguuni, joka aukesi merelle päin, minkä vuoksi paikka ei ollut erityisen suojainen, vaan etenkin tuulisella säällä aallokko saattoi olla voimakasta. Pääosa pohjasta oli kalliota, ja rakkohaurua kasvoi suuressa osassa pohjaa. Osa levästä irtoili ja kasaantui pohjaan 30–50 cm syviksi matoiksi.

Rovholmarna oli tavallista suojaisempi lahti, jossa veden virtaus oli vähäistä. Rakkohauru kasvoi siellä hyvin matalalla, vain 1–2 metrin syvyydellä rannassa (taulukko 2). Näytteenottopaikan vieressä oli hiekkapohja.

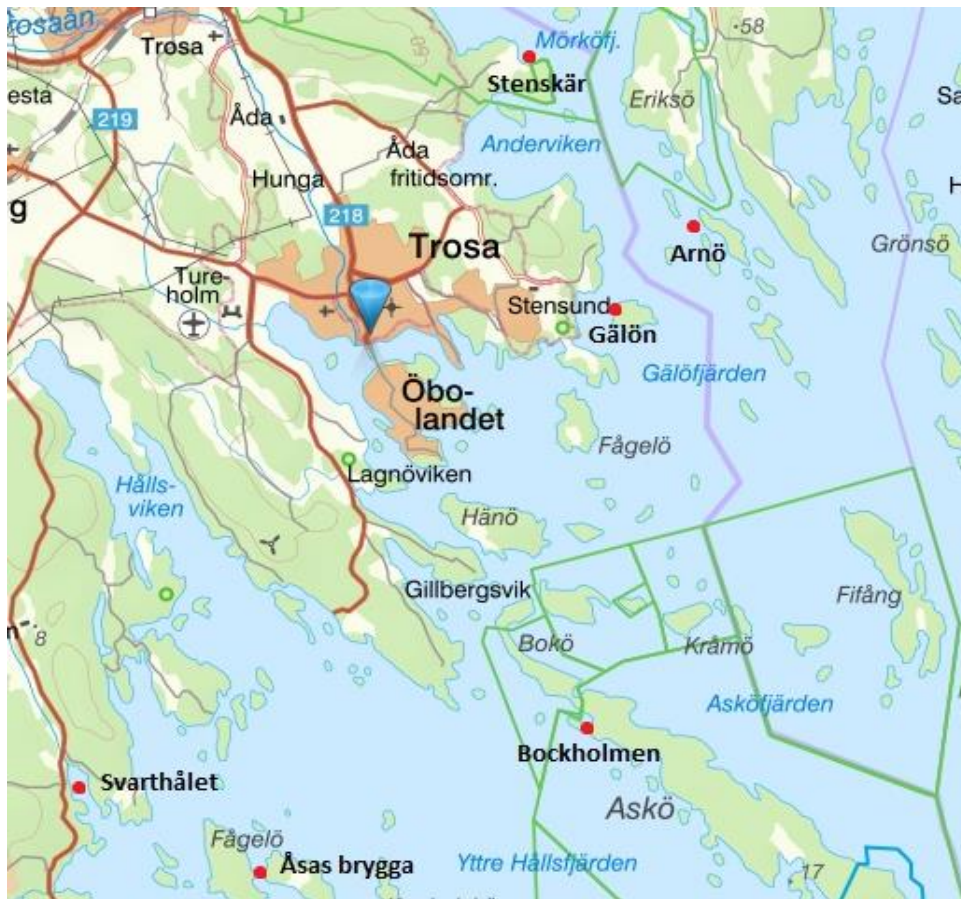
Kummelskärin näytteenottopaikka oli kohtuullisen suojainen, mutta etenkin länsi- ja itätuulella veden virtaus saattoi olla voimakasta. Rakkohauru kasvoi kallioisella pohjalla noin kolmen metrin syvyyteen asti. 3–4 metrin syvyydessä alkoi hiekkapohja, jossa rakkohaurua ei ollut enää juuri lainkaan. Tämä johtunee veden syvyydestä eikä pohjan laadusta, sillä Kummelskäristä löytyi myös irtonaista rakkohaurua.

Olkiluodon näytteet kerättiin noin 350 metrin päästä ydinvoimalan lauhdevesikanavasta, joka nosti veden lämpötilaa. Pinnalla lämpötila oli 28 °C, mutta kahden metrin syvyydessä oli jo huomattavasti viileämpää, joskaan tarkkaa lämpötilaa ei mitattu. Näytteitä kerättiin Olkiluodosta linjasukellusmenetelmällä kuudelta eri linjalta, joista jokainen oli 100 metriä pitkä. Tässä tutkimuksessa käsitellyt näytteet olivat linjalta B, Otpää. Kääpiömuotoista, irtonaista rakkohaurua kasvoi vain kahdessa keräyspisteessä, 2,3 ja 2,7 metrin syvyydellä (taulukko 2). Olkiluodossa rakkohaurun peittävyys ei missään kohta linjaa ylittänyt 20 %, ja kääpiömuodon peittävyys oli parhaimmillaankin vain 5 %.

Taulukko 2. Suomen ja Ruotsin rakkohaurunäytteiden keräyspaikat ja populaatioiden koodit. Gälönistä, Stenskäristä ja Arnöstä kerättiin sekä vapaita että kiinnittyneitä yksilöitä, minkä vuoksi kyseisistä paikoista on peräisin kaksi populaatiota kustakin; vapaat ja kiinnittyneet näytteet kuuluivat eri populaatioihin huolimatta siitä, että ne kasvoivat samassa paikassa. Vapaana kasvaneet levät kasvoivat hiekkapohjalla, kun taas kiinnittyneet olivat tyvilevyllään tiukasti kiinni kalliopohjassa. Keräyspaikkojen lisäksi taulukkoon on merkitty keräyspaikkojen syvyys, paikan koordinaatit ja kustakin paikasta kerättyjen vapaiden ja kiinnittyneiden yksilöiden lukumäärä (n).

Maa	Keräyspaikka	Populaation koodi	Keräyssyvyys (m)	Keräyspaikan koordinaatit	Vapaana kasvava (n)	Kiinnittynyt (n)
Ruotsi	Gälön	hH1 H1	2–4	58°53.673'N 17°37.671'E	20	20
	Stenskar	hH2 H2	2–4	58°56.213'N 17°36.442'E	20	20
	Arnö	hH3 H3	2–4	58°54.549'N 17°39.614'E	20	20
	Svarthålet	hA1	2–4	58°49.038'N 17°27.942'E	x	20
	Bockholmen	hA2	2–4	58°49.771'N 17°36.938'E	x	20
	Åsas brygga	hA3	2–4	58°48.360'N 17°30.887'E	x	20
Suomi	Spikarna	hT1	2–3	59°81.163'N 23°20.649'E	x	3
	Rovholmarna	hT2	1–2	59°83.900'N 23°24.913'E	x	3
	Kummelskar	hT3	≤ 3	59°81.239'N 23°10.628'E	x	4
	Olkiluoto	OB	2–3	61°14.160'N 21°25.284'E	2	x
<b>Kaikki</b>					<b>62</b>	<b>130</b>

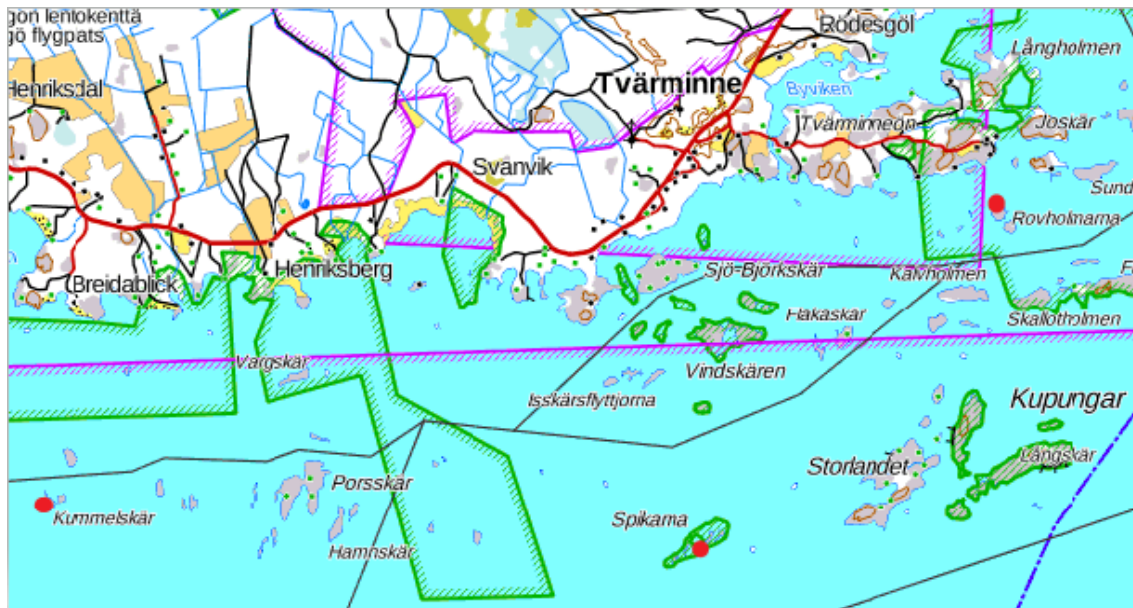




Kuva 5. Trosan alue, josta Ruotsin rakkohaurunäytteet kerättiin. Keräyspaikat (Arnö, Bockholmen, Gälön, Stenskär, Svarthålet ja Åsas brygga) on merkitty punaisilla palloilla. Kartor, Lantmäteriet. (2020)



Kuva 6. Olkiluoto, josta Suomen vapaana kasvaneet rakkohaurunäytteet kerättiin. Keräyspaikka on merkitty punaisella pallolla. Karttapaiikka, Maanmittauslaitos (2019).



Kuva 7. Tvärminne, josta Suomen kiinnittyneet rakkohaurunäytteet kerättiin. Keräyspaikat (Spikarna, Rovholmarna ja Kummelskär) on merkitty punaisilla palloilla. Karttapaikka, Maanmittauslaitos (2019).

## 2.2. Laboratorioanalyysit

### 2.2.1. Näytteiden käsittely

Tvärminnen näytteet kerättiin marraskuussa 2016 ja kuljetettiin Helsinkiin mustissa jätessäkeissä. Ne käsiteltiin neljän päivän sisällä keräämisestä ja säilytettiin viileässä (4 °C) valolta suojattuina, jotta ne säilyisivät mahdollisimman hyväkuntoisina. Laboratoriossa tuoreista näytteistä katkaistiin sekovarren kärjestä 5–10 cm pätkä, josta nypittiin pois kaikki eläimet ja epifyytit. Näytteet kuivatettiin ensin talouspaperin välissä, minkä jälkeen ne kuivatettiin Minigrip-pusseissa, joissa oli silikageeliä. Sekä Olkiluodon että Ruotsin näytteet saatiin käsiteltäviksi kuivattuina; ainakin Ruotsin näytteet oli käsitelty samalla tavoin kuin Tvärminnen näytteet. Sekä Olkiluodon että Ruotsin näytteet oli kerätty elokuussa 2016.

### 2.2.2. DNA:n eristäminen

DNA:n eristämiseen käytettiin Macherey-Nagelin NucleoSpin® Plant II -kittiä, joka on kehitetty genomisen DNA:n eristämiseen kasvikuudoksesta. Eristysmenetelmää oli käytetty aiemmin monilla eri kasvilajeilla ja levistä viherlevillä (Macherey-Nagel 2014).

Silikageelissä kuivatut levänäytteet punnittiin ja noin 20 mg näytettä homogenisoitiin jauhamalla näyte Eppendorff-putkessa muovisella survimella mahdollisimman hienoksi. Osassa jauhetuista näytteistä levä tarttui staattisen sähkön vuoksi kiinni survimeen, minkä seurauksena lopullinen DNA-eristykseen menevä näyte saattoi painaa huomattavasti vähemmän kuin 20 mg.

Jauhettujen levänäytteiden solut hajotettiin käyttämällä kemiallista lysispuskuriä PL1, joka on todettu käyttökelpoiseksi erilaisille kasveille sekä viherleville. Puskurin PL1 toiminta perustui CTAB-menetelmään (Macherey-Nagel 2014). DNA eristettiin kitin ohjeen mukaan, mutta inkubaatioaikaa pidennettiin suositellusta kymmenestä minuutista, sillä pidemmän vaikutusajan arveltiin lisäävän soluista vapautuvan DNA:n määrää. Näytteitä inkuboitiin 20–30 minuuttia 65 °C:ssa.

DNA:n eristämisen loput vaiheet suoritettiin kitin ohjeiden mukaisesti, minkä jälkeen DNA oli käyttövalmista mm. PCR:ää varten, ja se laitettiin säilöön jääkaappiin, 4 °C.

### **2.2.3. Polymeraasiketjureaktio (PCR)**

PCR-olosuhteita muokattiin useita kertoja, sillä pyrittiin selvittämään parasta tapaa monistaa riittävästi DNA:ta, joka erottuisi selkeästi ja jota olisi helppo tulkita genotyypausvaiheessa. Ensimmäisellä kerralla kokeiltiin näyte-DNA:ta sekä laimennoksia 1:10 ja 1:20. Tulosten perusteella laimennoksen vaikutus siihen, kuinka voimakkaana PCR-tuote näkyi geielektroforeesissa, oli ristiriitainen: osa näytteistä näkyi geelillä voimakkaimmin laimennettuina, kun taas osa oli selkeämpiä laimentamattomina. Laimennosta 1:10 käytettiin myöhemmin kaikissa PCR-reaktioon laitetuissa näytteissä, sillä sitä pidettiin hyvänä kompromissina, jonka arveltiin toimivan kaikille näytteille. PCR:n optimoimisessa kokeiltiin kahta DNA-polymeraasia: Phusion Flash II -polymeraasia (Thermo Scientific) ja One Taq Hot Start -polymeraasia (New England BioLabs). PCR:n optimoinnista kerrotaan tarkemmin liitteessä 1.

PCR-monistuksessa käytettiin kahdeksaa alukeparia (Taq Copenhagen A/S, Kööpenhamina, taulukko 3). Tarkoitus oli käyttää yhdeksää alukeparia, mutta aluke Fsp4 osoittautui niin

hankalaksi tulkita, että se poistettiin kokonaan tutkimuksesta (taulukko 4). Engel ym. (2003) olivat aiemmin käyttäneet alukkeita L17, L20, L38, L58, L78, L85, L94, L132 ja L138 tutkimuksessaan, joka kuvasi rakkohaurun (*Fucus vesiculosus*), sahalevän (*F. serratus*), kierreaurun (*F. spiralis*) ja solmulevän (*Ascophyllum nodosum*) DNA-mikrosatelliittimarkkereita. Perrin ym. (2007) puolestaan tutkivat Engel ym. (2003) käyttämien alukkeiden (L20, L38, L58, L78 ja L94) sekä lisäksi alukkeiden Fsp1, Fsp2, Fsp3, Fsp4 ja Fsp5 avulla rakkohaurun ja kierreaurun lisääntymissysteemien vaikutusta lajien väliseen geneettiseen erilaisuuteen. Kaikkien alukeparien F-alukkeet oli leimattu fluoresoivalla markkerilla (taulukko 3). Fluoresoivat markkerit absorboivat valoa tietyllä aallonpituudella, joka riippuu markkerista, ja lyhyen ajan kuluttua heijastavat valoa suuremmalla aallonpituudella (Herman ym. 2015). Tässä tutkimuksessa käytetyt markkerit olivat: Fam (sininen aallonpituus), Hex (vihreä aallonpituus) ja Tamra (musta aallonpituus).

Taulukko 3. PCR:ssä käytetyt alukkeet. Koodit Fam, Hex ja Tamra kuvaavat fluoresoivia väriaineita, joilla alukkeet leimattiin. Fam heijasti valoa sinisellä, Hex vihreällä ja Tamra mustalla aallonpituudella. Certificate Analysis, Taq Copenhagen A/S (2016).

<b>Aluke (emäsjärjestys)</b>	
L20 R (5'-CCTCGGTGATCAGCAATCAT-3')	L20 F (5'-Hex-ACTCCATGCTGCGAGACTTC-3')
L38 R (5'-TAACCTGTCGGTCGCAACG-3')	L38 F (5'-Fam-TGCTAGCTGCTCTTGTGTGC-3')
L58 R (5'-CCTTGCATGTAGGAGGGAAC-3')	L58 F (5'-Tamra-AAACGAAAATGGCACAGTGA-3')
L85 R (5'-TAGGATGATAGGGCCGGATT-3')	L85 F (5'-Tamra-GCTGAGTTGCCTTACCGACA-3')
L94 R (5'-GATTTTCGTGAGGCTGGTTCA-3')	L94 F (5'-Fam-TTAGGAATGGGCGGGATG-3')
Fsp1 R (5'-TCTTCTGGGAGCTGTAAAATAGTC-3')	Fsp1 F (5'-Hex-TCAAAAGCCAGCAGGGGTG-3')
Fsp2 R (5'-TTGTTTGAGTGCCACCTTGC-3')	Fsp2 F (5'-Fam-GCATCTGGTGTTCATTCTTGTTC-3')
Fsp3 R (5'-TGCATTGTATGTCCCTGTCCC-3')	Fsp3 F (5'-Tamra-TGGAGGCCCTCCACAGCC-3')
Fsp4 R (5'-GTGCTTCCCCTCCTTGTCTGTTG-3')	Fsp4 F (5'-Hex-ATGACCGGGCCGGATTGC-3')

PCR-olosuhteet optimoitiin jokaiselle alukkeelle erikseen (liite 1), mutta osa alukkeista pystyttiin yhdistämään samaan PCR-ajoon toisten alukkeiden kanssa. Kaikille tämä ei kuitenkaan onnistunut ja esim. aluke L20 jouduttiin ajamaan PCR:ssä yksinään, sillä sen vaatimat PCR-olosuhteet erosivat huomattavasti kaikkien muiden alukkeiden optimiolosuhteista. Optimoinnin tuloksena käytettiin taulukossa 4 kuvattuja syklejä.

Taulukko 4. Paneelien ja alukkeiden PCR-sykli. Osa alukkeista laitettiin samaan ajoon toisten alukkeiden kanssa. Touchdown-vaiheessa käsittelyn lämpötilaa lasketaan hiljalleen, esim. 1 °C/sykli. Touchdown lisää PCR:n tarkkuutta ja herkkyyttä sekä saatavan PCR-tuotoksen määrää jopa nelinkertaiseksi/1 °C ilman tarvetta pitkäkestoiseen ja vaikeaan PCR-syklin optimointiin (Korbie ja Mattick 2008).

Aluke	PCR-sykli
L38_Fsp1_Fsp3	1) 95 °C 5 min 2) (40x) 94 °C 30s, 55 °C 40s, 72 °C 30s 3) 72 °C 5 min, 20 °C ∞
Fsp2	1) 95 °C 5 min 2) (35x) 94 °C 30s, 55 °C 40s, 72 °C 30s 3) 72 °C 5 min, 20 °C ∞
L20	1) 95 °C 5 min 2) (5x) 95 °C 30s, 60–55 °C touchdown 1°C /sykli, 30s, 72 °C 30s 3) (35x) 95 °C 30s, 55 °C 30s, 72 °C 30s 4) 72 °C 5 min, 4 °C ∞
L58	1) 95 °C 5 min 2) (35x) 94 °C 30s, 52 °C 40s, 72 °C 30s 3) 72 °C 5 min, 20 °C ∞
L85_L94	1) 95 °C 5 min 2) (5x) 95 °C 30s, 60–55 °C touchdown 1 °C /sykli, 30s, 72 °C 30s 3) (35x) 95 °C 30s, 55 °C 30s, 72 °C 30s 4) 72 °C 5 min, 4 °C ∞

#### 2.2.4. Genotyypaus

PCR-tuotteet eroteltiin 3730 DNA Analyzer -laitteella (Applied Biosystems). Jos alukkeet oli leimattu eri markkereilla, ne pystyttiin erottamaan toisistaan. Tällöin ne saatettiin laittaa genotyypauksessa samaan paneeliin, vaikka niitä ei oltu voitu monistaa PCR:ssä yhtä aikaa (taulukko 5).

Taulukko 5. Genotyypauksessa käytetyt paneelit. Erivärisillä markkereilla leimatut alukkeet voitiin erottaa toisistaan genotyypauksessa. Tällöin ne voitiin laittaa samaan paneeliin sellaistenkin alukkeiden kanssa joiden kanssa niitä ei oltu voitu monistaa PCR:ssä.

Paneeli	Aluke	Fluoresoiva markkeri
1	L20	Hex
	L85	Tamra
	L94	Fam
2	L58	Tamra
	Fsp2	Fam
3	L38	Fam

Genotyypauksen tuloksena syntynyt raakadata esitettiin kromatogrammeina, jotka tulkittiin GeneMapper 5.0 -ohjelmalla, jolloin saatiin selville oliko kyseinen näyte tällä alukkeella monistettuna homo- vai heterotsygoottinen. Homotsygoottisilla yksilöillä esiintyi aineistossa vain yksi piikki sen merkinä, että molemmat alleelit olivat samankokoiset. Heterotsygoottisilla yksilöillä puolestaan esiintyi kaksi piikkiä kahden erikokoisen alleelin merkinä. Tietoa yksilöiden homo- tai heterotsygotiasta käytettiin tilastollisten testien perustana, kun verrattiin populaatioita toisiinsa. Poikkeuksena tähän olivat lokukset L38 ja Fsp2, joiden kromatogrammeissa oli havaittavissa kolme tai useampia piikkejä, mikä viittaa polyploidiaan, eli siihen että yksilöllä on enemmän kuin kaksi kromosomia. Nämä lokukset poistettiin jatkoanalyyseistä.

### 2.3. Aineiston analysointi

Aluksi laskettiin alleelien määrä jokaisessa lokuksessa/populaatio (liite 2). Aineiston analysointia varten aineistosta poistettiin yksilöt, joista ei oltu saatu riittävästi tietoa.

Tällaisiksi laskettiin ne yksilöt, joiden kohdalla neljästä tai useammassa lokuksessa ei saatu tulosta. Aineisto analysoitiin GenClone 2.0 -ohjelmalla (Arnaud-Haond & Belkhir 2007) ja samaan populaatioon kuuluvista, klooneiksi tulkittavista identtisistä multilokusgenotyypeistä jätettiin jäljelle vain yksi, jotta ne eivät vääristäisi tuloksia. Eri populaatioissa olevat identtisistä multilokusgenotyypeistä säilytettiin kaikki, sillä on epätodennäköistä, että ne olisivat klooneja. Lopulliseksi testattavien yksilöiden määräksi jäi 169 kpl (taulukko 6).

Taulukko 6. Tilastollisissa analyyseissä käytettyjen rakkohaurunäytteiden määrä eri populaatioissa. Pohjaan kiinnittyneet populaatiot erotettiin vapaina kasvaneista siten, että vapaina kasvaneet merkittiin esim. H1, ja kiinnittyneet esim. hH1, eli mikäli populaation nimessä on pieni h, kyseessä on kiinnittynyt populaatio. Samassa populaatioissa olevat yksilöt, joilla oli identtinen multilokusgenotyyppi (alleelikombinaatio kahdessa tai useammassa lokuksessa), poistettiin analyyseistä, jolloin jäljelle jäi yhteensä 169 kpl testattavia yksilöitä.

Populaatio	hA1	hA2	hA3	hH1	hH2	hH3	hT1	hT2	hT3	H1	H2	H3	OB
<b>Analysoitujen yksilöiden lukumäärä</b>	17	20	19	18	17	18	3	3	4	13	16	19	2

Koska polyploidiaa ei voitu tämän työn puitteissa varmistaa, päätettiin lokukset L38 ja Fsp2, joissa oli polyploideiksi tulkittuja yksilöitä, jättää testien ulkopuolelle. Niiden vaikutuksen arveltiin olevan sama kaikkiin yksilöihin, joten niiden pois jättämisen ei uskottu vaikuttavan johtopäätöksiin. Kaikkien populaatioiden Hardy-Weinbergin tasapainoa tutkittiin Genepop on the Web -ohjelman (Raymond & Rousset 1995; Rousset 2008) eksaktilla testillä. P-arvot selvitettiin Markovin ketjumenetelmällä (Guo & Thompson 1992). Hardy-Weinbergin lain mukaan suuressa populaatioissa, jossa parituminen on satunnaista eikä valintaa, mutaatiota tai migraatiota esiinny, alleeli- ja genotyyppifrekvenssit pysyvät samoina sukupolvea toiseen. Odotettu heterotsygotia kuvaa, kuinka monen yksilö HW-tasapainossa olevassa populaatioissa odotetaan olevan heterotsygootti tietyn alleelin suhteen. Populaatiosta analysoitiin myös havaittu heterotsygotia. Poikkeama HW-tasapainosta kertoo, sopiiko populaatioissa havaittu heterotsygotian määrä HW-testin perusteella odotettuun heterotsygotian määrään.



Seuraavaksi testattiin molekyylivarianssia ja Wrightin F-arvoja käyttäen GenAlEx 6.5:ttä, joka on geneettisten analyysien suorittamiseen tarkoitettu Excelin lisäosa (Peakall & Smouse 2006, 2012). Käytetty analyysi oli AMOVA (Analysis of Molecular Variance). AMOVA on geneettiseen etäisyyteen perustuva analyysimenetelmä, joka sopii kaikenlaisen geneettisen materiaalin analysointiin. Se arvioi muuntelun jakautumista hierarkian eri tasoille ja sen avulla voidaan arvioida geneettisen vaihtelun jakautumista populaatioiden ja alueiden välillä (Excoffier ym. 1992). Tässä työssä analyysit tehtiin käyttäen kahta erilaista mallia. Ensimmäisessä mallissa hierarkian ylempänä tasona oli maiden välinen vaihtelu ja alempana tasona populaatioiden välinen vaihtelu. Toisessa mallissa hierarkian ylempänä tasona käytettiin kasvumuotojen välistä vaihtelua ja alempana tasona populaatioiden välistä vaihtelua. AMOVA analysoi merkitsevyyttä satunnaisilla permutaatioilla, joissa jokainen näyte sijoitetaan populaatioihin satunnaisesti ja jokaiselle satunnaispermutaatiolle lasketaan AMOVA, ja tätä toistetaan 100–1000 kertaa (Peakall & Smouse 2006, 2012). Satunnaispermutaatioiden tarkoituksena on selvittää, olisivatko havaitut erot voineet syntyä sattumalta. AMOVA:n tulos on jokaiselle permutaatiolle erilainen, mutta mitä useampia permutaatioita tehdään, sitä suuremmalla todennäköisyydellä saadaan hyvä arvio siitä, onko nollahypoteesi ( $H_0$ , populaatioiden välillä ei ole geneettistä eroavaisuutta) tosi. Havaittua arvoa verrataan permutaatioiden tuloksiin sen selvittämiseksi, onko havaittu arvo ennustettua arvoa merkittävästi suurempi.

GenAlEx 6.5:n AMOVA analysoi varianssikomponenttien lisäksi myös F-arvoja (Peakall & Smouse 2006, 2012). F-arvot kuvaavat hierarkkisesti jakautuneiden populaatioiden ominaisuuksia (Wright 1965).  $F_{IS}$ -arvo eli yksilön erilaistumiskerroin suhteessa osapopulaatioon mittaa, missä määrin yksilön heterotsygotian lasku johtuu osapopulaatiossa tapahtuneesta epäsatunnaisesta lisääntymisestä (Peakall & Smouse 2006, 2012). Tämän avulla on pääteltävissä, onko aineiston genotyyppien jakauma syntynyt sattumanvaraisen lisääntymisen seurauksena (Long 1986).  $F_{IS}$ -arvot vaihtelevat 1 ja -1 välillä. Mitä lähempänä nollaa  $F_{IS}$ -arvo on, sitä vähemmän se eroaa odotetusta heterotsygotiasta. Negatiiviset  $F_{IS}$ -arvot kuvaavat tavallista yleisempää heterotsygotiaa ja positiiviset arvot puolestaan ovat yleistyneen homotsygotian merkki, mikä puolestaan viittaa sisäsiittoisuuteen tai havaitsemattomiin nolla-alleeleihin.  $F_{IT}$ -arvo puolestaan on erilaistumiskerroin suhteessa koko populaatioon ja ottaa huomioon sekä osapopulaatiossa tapahtuvan epäsatunnaisen

lisääntymisen että geneettisen ajautumisen osapopulaatioissa (Peakall & Smouse 2006, 2012). Tässä työssä osapopulaatioita ovat kaikki tutkimuksessa mainitut osapopulaatiot (hA1, hH1, H1, jne.) kun taas koko populaatioon kuuluvat kaikki Suomen ja Ruotsin rakkohaurut, sekä vapaana kasvavat että kiinnittyneet. Arvot  $F_{RT}$  ja  $F_{SR}$  kuvaavat yksilöiden välistä erilaistumista alueiden välillä ja niiden sisällä (Olsen ym. 2004). Tässä työssä siis  $F_{RT}$  kuvaa siis erilaistumista joko Suomen ja Ruotsin tai vapaana kasvaneiden ja kiinnittyneiden kasvumuotojen välillä.  $F_{SR}$  puolestaan kuvaa erilaistumista alemmalla hierarkian tasolla, siis populaatioiden välistä erilaistumista joko alueiden (Ruotsi ja Suomi) tai kasvumuotojen (vapaat ja kiinnittyneet) sisällä.

Tässä työssä AMOVA:lla analysoitiin varianssikomponentteja koko aineiston suhteen. Lisäksi suoritettiin parittaisten populaatioiden vertailu, jonka tulokset olivat F-arvoja. Molemmissa analyyseissä permutaatioita toistettiin 999 kertaa. Kaikki arvot testattiin sekä Suomen ja Ruotsin populaatioiden että kiinnittyneiden ja vapaana elävien populaatioiden välillä.

GenAlEx 6.5 avulla arvioitiin populaatioiden välistä geneettistä eroavuutta myös mittaamalla Nein etäisyyttä, joka on tilastollinen menetelmä geneettisten erojen ja niiden syntymiseen kuluneen ajan estimointiin (Nei 1971). Nein etäisyyksien perusteella analysoitiin populaatioiden erilaistumista (kuva 8) pääkoordinaattianalyysillä (Principal Coordinates Analysis, PCoA), jossa näytteiden jakautuminen esitetään pääkoordinaattien avulla. PCoA on menetelmä, joka muuttaa populaatioiden parittaiset etäisyydet visuaaliseen muotoon, jossa niitä on helpompi tulkita. Tällä tavoin PCoA paljastaa populaatorakenteen oleelliset piirteet muuttamatta itse aineistoa. Pääkoordinaattianalyysissä variaatioita kuvaavat moniulotteisessa datajoukossa sijaitsevat akselit. Jokainen akseli selittää edellistä pienemmän osuuden kokonaisvariaatiosta. Näin ollen, mikäli aineistossa on selkeästi toisistaan erottuvia ryhmiä, kaksi tai kolme ensimmäistä akselia selittävät suurimman osan ryhmien välisestä vaihtelusta (Peakall & Smouse 2006, 2012).

Lisäksi aineisto analysoitiin BAPS 6.0 -ohjelmalla (Corander ym. 2008). BAPS 6.0 (Bayesian Analysis of Population Structure, Bayesilainen populaatorakenteen analyysi) tutkii, onko olemassa erilaisia geneettisiä ryhmiä, klustereita, jotka ovat kehittyneet ajan

kuluessa geneettisen ajautumisen seurauksena. BAPS 6.0:n toiminta perustuu Bayesilaiseen tilastomalliin, joka laskee vaihtoehtoisille malleille posterior-todennäköisyyksiä. Näin ollen myöskään BAPS 6.0 ei anna täysin varmaa vastausta, vaan laskee todennäköisyyksiä klusterien määrälle ja eri yksilöiden jakautumiselle klustereihin. BAPS 6.0:ssa tehtiin mixture-analyysi, joka perustuu oletukseen, että tutkittava aineisto on peräisin toisistaan erillisistä osapopulaatioista (Francois & Durand 2010).

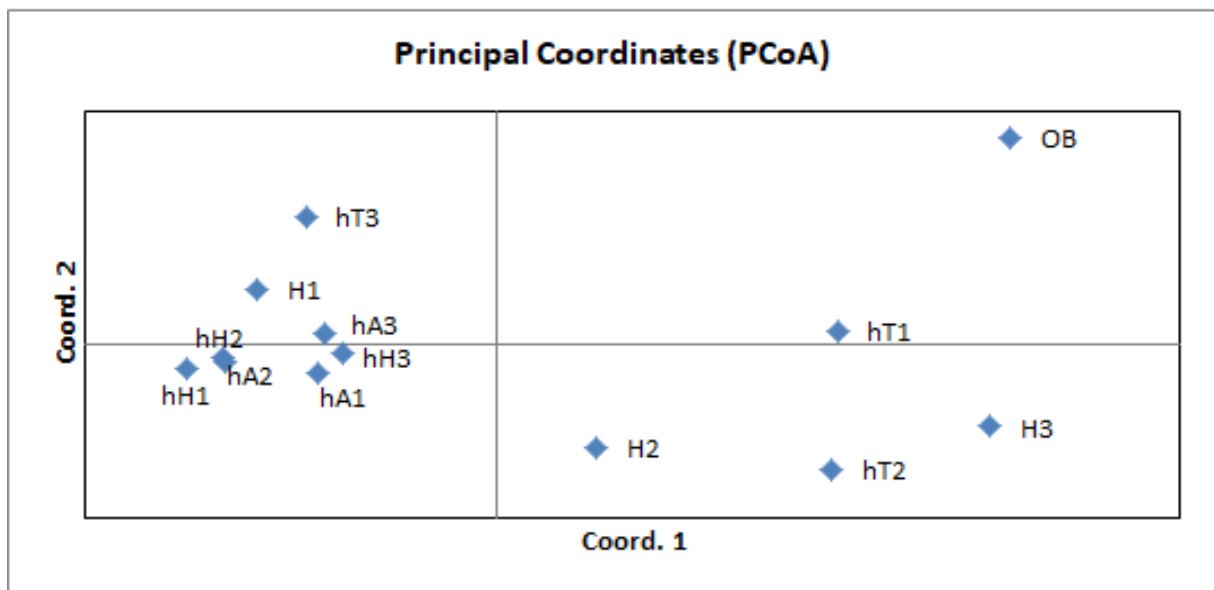
### 3. Tulokset

Aineistosta löytyi mahdollisia klooneja vain kolmesta eri näytteenottopaikasta: Gälönistä (H1, hH1), Stenskäristä (H2) ja Arnöstä (H3). Havaituista samassa populaatiossa olevista identtisen multilokusgenotyypin omaavista yksilöistä jätettiin jäljelle vain yksi. Jatkoanalyyseistä poistettiin mahdolliset kloonit H1:19, hH1:9, H2:6, H2:17 ja H3:4.

Alleelien määrä tutkituissa DNA-mikrosatelliittilokuksissa oli enimmillään 9 ja vähimmillään 1/lokus/populaatio (liite 3). Keskimäärin yhdessä lokuksessa oli 3,8 alleelia. Keskimäärin yhdessä populaatiossa, mukaan lukien kaikki lokukset, oli 17,5 alleelia. Alleelien määrä populaatioissa vaihteli 9:stä (Spikarna, hT1) 22:een (Svarthålet, hA1, Bockholmen, hA2 ja Arnö, H3) (liite 2).

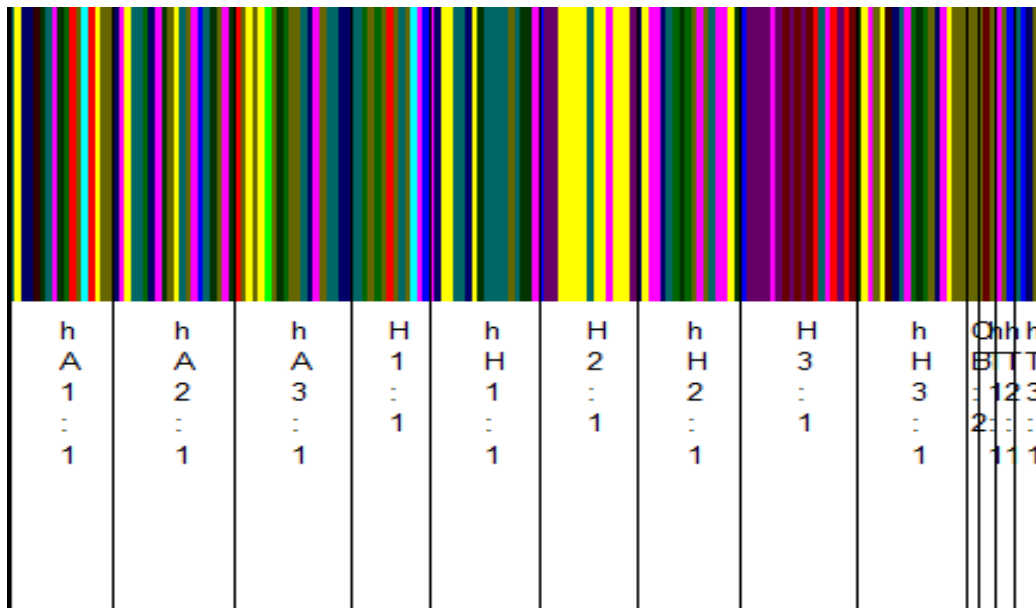
Hardy-Weinbergin analyysissä P-arvojen rajaksi asetettiin 0,01, ja mikäli P-arvo oli tätä alhaisempi, katsottiin, ettei populaatio ole HW-tasapainossa. Hardy-Weinberg -analyysissä havaittiin, että vain neljä populaatiota 13:sta (populaatiot H1, hT1, hT2 ja hT3) oli Hardy-Weinbergin tasapainossa lokuksen Fsp3 suhteen, eikä Olkiluodon populaatiosta saatu tietoja, minkä vuoksi lokus Fsp3 jouduttiin jättämään pois jatkoanalyyseistä (liite 4). Koska Fsp4 oli aiemmin todettu liian hankalaksi tulkita ja Fsp2 ja L38 olivat mahdollisesti polyploideja, jäljelle jäi lopulta vain viisi lokusta: L20, L58, L85, L94 ja Fsp1. Populaatioiden välillä oli suurta vaihtelua sen suhteen, kuinka monen lokuksen osalta ne olivat HW-tasapainossa. Kaksi populaatiota (H2 ja H3) oli HW-epätasapainossa kolmessa lokuksessa, kun taas populaatiot hT1, hT2, hT3 ja H1 olivat tasapainossa kaikissa lokuksissa, joskaan populaatiossa hT3 ei saatu informaatiota lokuksesta L94 (liite 4). Olkiluodon populaatiosta (OB) saatiin tuloksia vain kahdessa kuudesta lokuksesta (lokukset L85 ja L94) (liite 4).

Nein geneettisen etäisyyden ja sitä kuvaavan pääkoordinaattianalyysin perusteella voidaan tehdä hyvin vähän arvioita populaatioiden geneettisestä erilaisuudesta. Populaatiot ovat jakautuneet kolmeen klusteriin, eikä vapaiden ja kiinnittyneiden populaatioiden välillä näytä olevan eroja (kuva 8). Myöskään Suomen ja Ruotsin populaatioiden välillä ei kuvassa 8 näy merkittäviä eroja. Ainoa poikkeus on Olkiluodon populaatio OB, joka on geneettisesti hyvin erilainen muihin populaatioihin verrattuna.



Kuva 8. Nein parittaisiin geneettisiin etäisyyksiin perustuva pääkoordinaattianalyysi (Principal Coordinates Analysis, PCoA). Koordinaatti 1 selittää koko aineiston variaatiosta noin 45 % ja koordinaatti 2 noin 21 %.

BAPS 6.0:n perusteella aineisto jakautuu 14 klusteriin ja todennäköisyys sille, että klusterien määrä on nimenomaan 14, on  $p=0.99$ . Klustereita on eri määrä kuin populaatioita, eivätkä ne seuraa populaatioiden rajoja, vaan jokaisessa klusterissa on yksilöitä useammasta kuin yhdestä populaatiosta (kuva 9). Aineisto ei myöskään jakaudu klustereihin kasvumuotojen tai maiden perusteella, eikä maiden tai kahden eri kasvumuodon välillä ole havaittavissa merkittävää eroa.

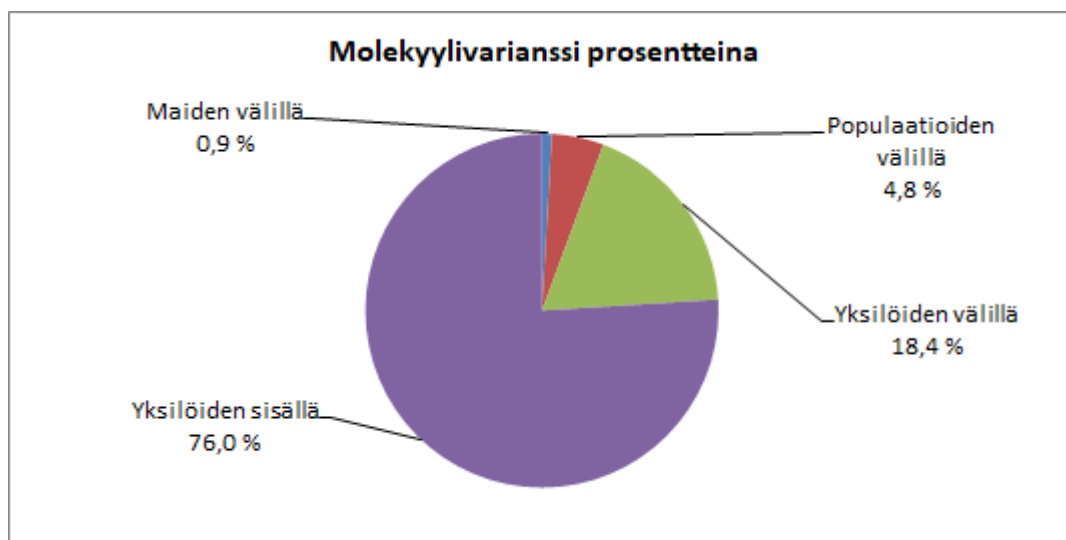


Kuva 9. Mixture-analyysin tulos BAPS 6.0:ssa. Aineisto jakautuu 14 klusteriin, joita kuvataan eri väreillä. Klustereita on eri määrä kuin populaatioita, joita on 13. Klusterit eivät seuraa populaatioiden rajoja, eikä kasvumuotojen tai maiden välillä ole havaittavissa tilastollisesti merkittävää eroa.

AMOVA:ssa ei aineiston analysoinnin perusteella Suomen ja Ruotsin populaatioiden välillä ollut havaittavissa merkitsevää eroa.  $F_{RT}$  -arvo, joka kuvaa erilaistumista alueiden välillä, on vain 0,009 ja sen P-arvo on 0,139 (rajana käytettiin P-arvoa 0,01), mikä kertoo, ettei epäsätunnaista lisääntymistä ole havaittavissa (taulukko 7). Tämä viittaa siihen, että rakkohauruysilöt lisääntyvät yhtä todennäköisesti molemmista maista peräisin olevien yksilöiden kanssa. Maiden välinen erilaistuminen selittää alle yhden prosentin populaatioissa havaitusta molekyyliarianssista (kuva 10). Sen sijaan P-arvo on kaikilla muilla hierarkian tasoilla alle 0,01, eli tilastollisesti merkittäviä eroja on havaittavissa (taulukko 7). Yksilöiden välillä ja yksilöiden sisällä ( $F_{IS}$  ja  $F_{IT}$  -arvot) tämä on normaalia, mutta populaatioiden välistä erilaistumista kuvaava  $F_{SR}$  -arvo viittaa siihen, että rakkohauruysilöt lisääntyvät todennäköisemmin muiden samasta populaatiosta peräisin olevien yksilöiden kanssa.

Taulukko 7. Suomen ja Ruotsin populaatioiden vertailu. Maiden välinen erilaistuminen ei ole tilastollisesti merkitsevää (P-arvo on yli 0,01). Tämä viittaa siihen, että rakkohauruysilöt lisääntyvät yhtä todennäköisesti kummastakin maasta peräisin olevien yksilöiden kanssa.

F-arvo	Arvo	P-arvo
$F_{RT}$	0,009	0,139
$F_{SR}$	0,048	0,001
$F_{IS}$	0,195	0,001
$F_{IT}$	0,240	0,001

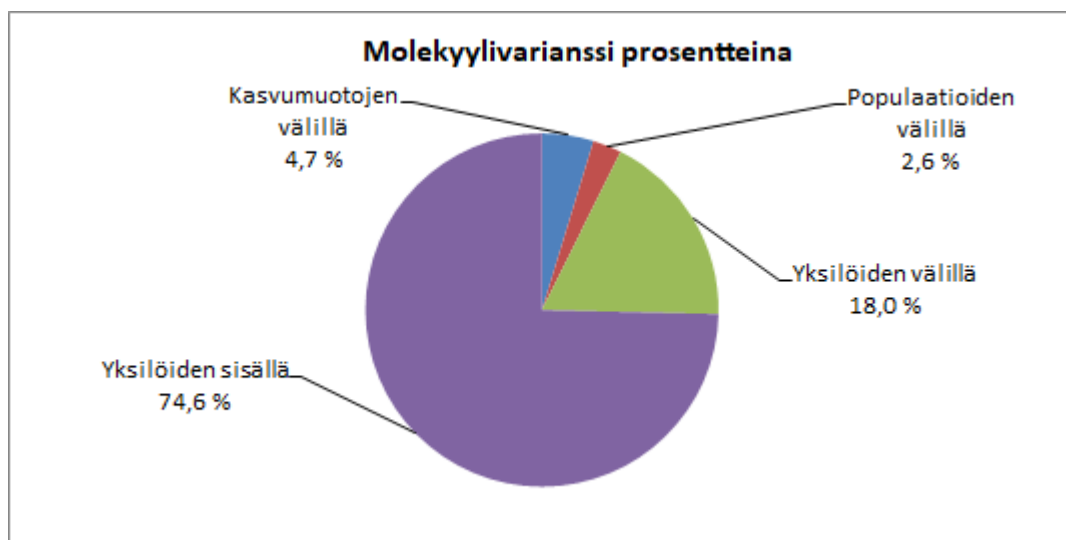


Kuva 10. Ruotsin ja Suomen populaatioiden vertailu. Maiden välinen vaihtelu selittää alle 1 % kokonaisvaihtelusta. Ero ei ole tilastollisesti merkittävä.

Toisin kuin BAPS 6.0 -analyysissä, GenAlEx 6.5:lla tehdyn AMOVA:n mukaan kiinnittyneiden ja vapaana elävien rakkohaurun muotojen välillä on tilastollisesti merkitsevä ero. Kasvumuotojen välistä erilaistumista mittaava  $F_{RT}$  -arvo on 0,047 ja sen P-arvo 0,001, mikä todistaa että epäsatunnaista lisääntymistä esiintyy ja rakkohauruysilöt lisääntyvät todennäköisemmin muiden saman kasvumuodon yksilöiden kanssa (taulukko 8). Vapaiden ja kiinnittyneiden rakkohaurun tyyppien välinen vaihtelu selittää noin 4,7 % kokonaisvaihtelusta (kuva 11). Tämä ero on suurempi kuin eri populaatioiden väliset erot ( $F_{SR}$  -arvo), jotka nekin ovat tilastollisesti merkitseviä (taulukko 8, kuva 11).

Taulukko 8. Vapaana elävien ja kiinnittyneiden populaatioiden välinen vertailu. Vapaana elävien ja kiinnittyneiden kasvumuotojen välillä oli merkitsevä ero (P-arvo alle 0,01). Tämä viittaa siihen, että vapaana kasvavat yksilöt lisääntyvät todennäköisemmin toisten vapaana kasvavien ja kiinnittyneet yksilöt toisten kiinnittyneiden yksilöiden kanssa.

<b>F-arvo</b>	<b>Arvo</b>	<b>P-arvo</b>
$F_{RT}$	0,047	0,001
$F_{SR}$	0,028	0,001
$F_{IS}$	0,195	0,001
$F_{IT}$	0,254	0,001



Kuva 11. Kiinnittyneiden ja vapaana elävien populaatioiden vertailu. Kasvumuotojen välinen ero selittää vaihtelusta noin 4,7 %, kun taas populaatioiden vaihtelu selittää hieman yli kaksi prosenttia kokonaisvaihtelusta. Molemmat tulokset ovat tilastollisesti merkitseviä.



## 4. Tulosten tarkastelu

### 4.1. Ruotsin ja Suomen väliset erot

Tutkimuksen tuloksena saatiin selville, että Suomen ja Ruotsin rakkohaurupopulaatiot eivät eroa toisistaan geneettisesti. Tämä oli linjassa Bergström ym. (2005) saamien tulosten kanssa. Bergström ym. (2005) havaitsivat geneettisen ja maantieteellisen etäisyyden olevan rakkohaurulla riippumattomia toisistaan, eivätkä rakkohaurun populaatiot välttämättä muistuttaneet geneettisesti eniten sitä populaatiota, joka kasvoi maantieteellisesti/sijainniltaan lähimpänä. Bergström ym. (2005) mukaan geenivirran erilaisuus eri alueilla saattaa ylläpitää geneettisen eroavaisuuden riippumattomuutta maantieteellisestä etäisyydestä. Näin on kenties käynyt Itämeressä, missä suvullinen lisääntyminen vähitellen vähenee ja suvuton lisääntyy siirryttäessä kohti alueita, joilla meriveden suolapitoisuus on pienempi (Pereyra ym. 2009).

Joissakin *Fucus*-suvun leviä käsittelevissä tutkimuksissa on kuitenkin saatu erilaisia tuloksia. Coyer ym. (2003) tutkivat sahalevän, *Fucus serratus*, lisääntymistä ja keräsivät näytteitä Nova Scotiasta, Islannista, Skagerrak-Kattegat-Itämeri -alueelta, Britannian niemimaalta, Pohjanmereltä ja Pohjois-Espanjasta. He havaitsivat, että sen sukusolut leviävät vain 1–2 metrin päähän aikuisesta yksilöstä. Tämän vuoksi Coyer ym. (2003) analysoivat alleelien klusteroitumista 0–100 metrin matkalla havaitakseen mahdollisen sisäsiirtoisuuden. He eivät kuitenkaan havainneet mitään tällaiseen viittaavaa, vaan tulivat siihen tulokseen, että tällaisilla etäisyyksillä gameettien leviäminen ei ole rajoittava tekijä. Sen sijaan pidemmillä välimatkoilla (>2km) Coyer ym. (2003) havaitsivat maantieteellisen etäisyyden vaikuttavan joillakin tutkimusalueilla populaatioiden geneettiseen etäisyyteen toisistaan siten, että kauempana toisistaan olevat populaatiot olivat myös geneettisesti kaukaisempaa sukua toisilleen kuin lähialueiden populaatiot. He saivat tämän kaltaisia, tilastollisesti merkittäviä tuloksia Skagerrak-Kattegat-Itämeri -alueelta, Itä-Tanskasta ja Bretagnesta. Coyer ym. (2003) tulokset eroavat tässä työssä saaduista tuloksista, joiden mukaan rakkohaurun populaatiot Ruotsissa ja Suomessa eivät eroa tilastollisesti merkitsevästi toisistaan. Coyer ym. (2003) eivät myöskään havainneet että sahalevän maantieteellinen ja geneettinen etäisyys korreloisivat keskenään Länsi-Ruotsissa tai Itä-Ruotsin ja Kielin (Saksa) alueella. Mahdollinen selitys tämän tutkimuksen ja Coyerin (2003) tulosten välisille eroille on se, että rakkohauru leviää sahalevää tehokkaammin. Myös erot tutkimusalueiden välillä lienevät

mahdollisia, minkä vuoksi Skagerrak-Kattegat-Itämeri -alueella, Itä-Tanskassa ja Bretagnessa kasvavat *Fucus*-suvun levät eivät leviäisi yhtä laajalle alueelle kuin Länsi-Ruotsissa tai Itä-Ruotsin ja Kielin (Saksa) alueella.

#### **4.2. Vapaana kasvavien ja kiinnittyneiden populaatioiden väliset erot**

Tämän tutkimuksen perusteella vapaiden ja kiinnittyneiden rakkohaurun muotojen välinen vaihtelu selittää aineiston kokonaisvaihtelusta noin 4,7 %, mikä on tilastollisesti merkitsevä tulos. Tutkimustuloksista voidaan päätellä, että koska kasvumuotojen välillä on geneettisiä eroja, pehmeiden pohjien rakkohaurupopulaatiot ovat ainakin osittain kykeneviä ylläpitämään itseään suvullisen tai suvuttoman lisääntymisen avulla, ja siis riippumattomia kiinnittyneistä populaatioista. Tutkimuksessa ei selvitetty, lisääntyvätkö populaatiot todennäköisemmin suvuttomasti vai suvullisesti. Vaikka suvuton lisääntyminen on harvinaista rakkohaurulla, sitä kuitenkin esiintyy (Tatarenkov ym. 2005). Tatarenkov ym. (2005) tutkivat rakkohaurupopulaatioita, joissa oli 48–50 yksilöä kussakin. He havaitsivat, että tavanomaista rakkohaurun muotoa edustavista populaatioista osassa oli 7–9 yksilöä, joilla oli sama multilokusgenotyyppi, eli ne saattoivat olla klooneja. Tämän todennäköisyys lisääntyy Tatarenkov ym. (2005) tutkimuksen mukaan matalissa suolapitoisuuksissa. Kääpiömuodolla, joka edusti mahdollisesti itämerenhaurua (*F. radicans*), identtiset multilokusgenotyypit olivat huomattavan yleisiä, niin että toisessa populaatiossa 35/48 yksilöä (73 %) ja toisessa 40/48 yksilöä (83 %) olivat genotyypiltään identtisiä (Tatarenkov ym. 2005). Tässä työssä ei selvitetty molekyylianalyysillä, ovatko tutkitut yksilöt rakko- vai itämerenhaurua, vaan luotettiin morfologiseen määrittelyyn. Vaikka runsas morfologinen ja fysiologinen vaihtelu on yleistä *Fucus*-suvussa ja etenkin rakkohaurulla (Powell (1963) Bergström ym. (2005) mukaan), Bergström ym. (2005) havaitsivat, että morfologinen vaihtelu on harvinaisempaa itämerenhaurulla ja että lajit ovat erotettavissa toisistaan ilman DNA-testejä.

Myös tässä tutkimuksessa havaittiin yksilöitä, joilla oli identtinen multilokusgenotyyppi. Mikäli yksittäisen populaation yksilöistä useammalla oli sama multilokusgenotyyppi, ne tulkittiin klooneiksi ja analyysistä poistettiin kaikki kyseisen multilokusgenotyypin omaavat yksilöt yhtä lukuun ottamatta, jotta ne eivät vääristäisi saatuja tuloksia. Eri populaatiossa olevista identtisistä multilokusgenotyypeistä säilytettiin kaikki, sillä on epätodennäköistä, että

ne olisivat klooneja. Joissakin tämän tutkimuksen populaatioissa kloonit olivat tavanomaisempia kuin toisissa. Populaatiosta H2 (Stenskär, vapaana kasvava) jätettiin testaamatta kaksi yksilöä, joita epäiltiin klooneiksi, kun taas esimerkiksi populaatiosta hA1 (Svarthålet, kiinnittynyt) ei löytynyt yhtään kloonia. Mahdollisia klooneja löytyi vain kolmesta eri näytteenottopaikasta: Gälönistä (vapaa (H1) ja kiinnittynyt (hH1) populaatio), Stenskäristä (vapaa populaatio, H2) ja Arnöstä (vapaa populaatio, H3). Syytä siihen, miksi nimenomaan näissä paikoissa kasvoi mahdollisia klooneja, ei tiedetä. Paikat sijaitsevat Trosan sisäsaaristossa (kuva 5), mutta eivät muutoin eroa merkittävästi muista näytteenottopaikoista. On kuitenkin havaittavissa, että kaikista tutkituista vapaana kasvavista populaatioista yhtä lukuun ottamatta löytyi useampia yksilöitä, joilla oli identtinen multilokusgenotyyppi. Koska tutkimuksen aineisto oli varsin pieni, ei voida tämän tutkimuksen perusteella sanoa, kloonautuvatko vapaana kasvavat rakkohaurut todennäköisemmin kuin kiinnittyneet. Asian selvittämiseksi vaadittaisiin lisätutkimuksia. Tämän tutkimuksen tulosten perusteella vaikuttaa kuitenkin siltä, että analysoiduissa populaatioissa aseksuaalinen lisääntyminen on harvinaista, mistä kielii kloonien melko vähäinen määrä; useimmissa populaatioissa ei ollut lainkaan yksilöitä, joilla olisi ollut sama multilokusgenotyyppi kuin jollakin toisella yksilöllä. Mikäli identtisiä multilokusgenotyyppisiä esiintyy, mutta vain vähän, on mahdollista että ne olisivat eissattumanvaraisen lisääntymisen seurausta (Tatarenkov ym. 2005). Tämän todennäköisyys kuitenkin laskee sitä mukaa kuin multilokusgenotyyppiltään identtisten yksilöiden määrä lisääntyy, jolloin tulee todennäköisemmäksi, että ne ovat klooneja (Tatarenkov ym. 2005).

Johannesson ym. (2011) tutkivat kloonautumista tarkemmin ja havaitsivat, että se on huomattavasti tavanomaisempaa itämeren- kuin rakkohaurulla, mutta että se on molemmilla tavallisempaa Itämeren pohjoisosissa. Pereyra ym. (2009) uskovat tämän johtuvan pohjoisen Itämeren vähäisestä suolapitoisuudesta. Sekä eläin- että kasvilajeilla on aiemmin havaittu marginaalisissa elinympäristöissä elävien eliöiden lisääntyvän todennäköisemmin aseksuaalisesti (Bergström ym. 2005). Kloonien yleisyys joillakin alueilla saattaa Johannesson ym. (2011) mukaan geneettisen ajautumisen vuoksi johtaa geneettisen monimuotoisuuden heikkenemiseen. Balloux ym. (2003) vertasivat tietokoneella simuloidun saarimallin (island model) avulla toisiinsa aseksuaalista ja seksuaalista lisääntymistä. Heidän tulostensa perusteella suvuton lisääntyminen säilyttää kaikki erilaiset alleelit tehokkaammin

kuin suvullinen lisääntyminen, mutta eri genotyyppien määrä sen sijaan on vähäisempi aseksuaalisesti lisääntyvissä populaatioissa. Kun populaatiossa esiintyy sekä aseksuaalista että seksuaalista lisääntymistä, se on Balloux ym. (2003) mukaan genotyyppien ja alleelien esiintyvyyden suhteen lähes samankaltainen kuin puhtaasti seksuaalisesti lisääntyvä populaatio. Myös mm. Keightley & Otto (2006) tutkivat aihetta ja saivat selville, että monimuotoisuuden heikkeneminen liittyy rekombinaatioon. Aseksuaalisesti lisääntyvissä populaatioissa rekombinaatiota ei esiinny, minkä vuoksi niihin alkaa vähitellen kertyä haitallisia alleleja. Tämä periaate tunnetaan Mullerin räikkänä. Sen sijaan seksuaalinen lisääntyminen ja rekombinaatio saavat aikaan sen, että syntyy uusia genotyyppisiä, joissa on vähän haitallisia alleleja (Keightley & Otto 2006). Fucal-lahkon lajit ovat Itämeressä tärkeitä elinympäristöjä muodostavia lajeja, mikä yhdessä aseksuaalisen lisääntymisen mahdollisten haittojen kanssa sai Johannesson ym. (2011) uskomaan, että kloonien suurella määrällä populaatiossa tulisi olla merkitystä, kun valitaan suojelustrategiaa.

Kysymykseen siitä, ovatko vapaana kasvavat rakkohaurupopulaatiot lähtöisin lähialueiden kiinnittyneistä populaatioista vai kauempaa ei saatu tässä tutkimuksessa täyttä selvyttä. Nein etäisyyksiin perustuvan pääkoordinaattianalyysin perusteella samoilta alueilta peräisin olevat kiinnittyneet ja vapaana elävät populaatiot eivät välttämättä ole geneettisesti samankaltaisia. Lisäksi havaittiin, että samoilta kasvupaikoilta peräisin olevat kiinnittyneet (hH1 (Gälön), hH2 (Stenskär) ja hH3 (Arnö)) ja vapaat (H1 (Gälön), H2 (Stenskär) ja H3 (Arnö)) populaatiot eivät ole geneettisesti lähempänä toisiaan kuin kauempana olevia populaatioita (kuva 8). Tämä viittaa siihen, ettei vapaana kasvavien ja kiinnittyneiden populaatioiden maantieteellisellä etäisyydellä toisistaan ole yhteyttä niiden geneettiseen etäisyyteen. Myöskään AMOVA:ssa ei havaittu maiden välillä merkitsevää eroa geeneissä, mutta toisaalta taas populaatioiden välillä eroa on (kuva 10, taulukko 7). Tämä tarkoittaa, että vaikka jokainen populaatio eroaa selkeästi muista populaatioista, ei niiden ole havaittu muistuttavan alkuperämaansa populaatioita enempää kuin toisen maan populaatioita.

Olkiluodon populaation tulokset eroavat muiden populaatioiden tuloksista. Pääkoordinaattianalyysissä Olkiluodon näytteet muodostavat kokonaan oman klusterinsa joka on etäällä kahdesta muusta klusterista. On kuitenkin mahdollista, ettei ero ole todellinen vaan populaation pienuuden aiheuttama harha. Olkiluodon populaatiossa oli vain kaksi yksilöä,

eikä esimerkiksi Hardy-Weinberg -analyysissä saatu tuloksia kuin kahdella kuudesta lokuksesta. Analysoitujen yksilöiden vähäinen määrä Olkiluodon populaatiossa vaikuttaa myös muihin tuloksiin, mm. odotetun ja havaitun heterotsygotian arvoihin. Vaikka odotettu ja havaittu heterotsygotia muistuttavat keskiarvoiltaan muiden populaatioiden vastaavia (liite 2) tulokset ovat melko epäluotettavia populaation pienuuden vuoksi. Saatujen tulosten perusteella voidaan kuitenkin tehdä johtopäätös, että populaatio on heterotsygoottinen, sillä havaittu heterotsygotia on huomattavasti suurempaa kuin odotettu heterotsygotia. Tulosten varmistamiseksi tarvittaisiin kuitenkin lisää näytteitä.

Tutkimuksen aineisto oli varsin pieni, vain 169 yksilöä, ja analysoitavia DNA-mikrosatelliitteja oli vain viisi (ihanteellinen määrä on vähintään 20). Näin pieni aineisto ei riitä kertomaan, onko vapaana kasvavien ja kiinnittyneiden rakkohaurun muotojen erilaisuus laajempi, esimerkiksi koko Itämeren alueella havaittavissa oleva ilmiö, tai mitä vaikutuksia sillä voi tulevaisuudessa olla. Coyer ym. (2003) käyttivät tutkimuksessaan seitsemää itse kehittämäänsä DNA-mikrosatelliittia (FsA198, FsB113, FsB128, FsD39, FsE6, FsE9 ja FsF4). He analysoivat myös suhdetta joka lokuksen keskimääräisen alleeliluvun ja näytekoon välillä sekä selvittääkseen oliko näyte koko riittävä alleelien monimuotoisuuden selvittämiseen, että verratakseen alleelirikkuutta eri alueiden välillä (Coyer ym. 2003). Heidän tulostensa perusteella noin 50 yksilöä/näytepaikka on riittävä näyte koko, jotta voidaan luotettavasti analysoida geneettistä monimuotoisuutta (Coyer ym. 2003). Koska tässä tutkimuksessa näyte koko vaihteli 2–20 yksilön välillä/näytteenotto paikka ja käytössä oli vain viisi DNA-mikrosatelliittia, sekä näyte koko että DNA-mikrosatelliittien määrä olivat liian vähäisiä kaikilta osin luotettavien tutkimustulosten saamiseksi. Niinpä lisätutkimukset ovat tarpeen rakkohaurun kiinnittyneiden ja vapaina kasvavien muotojen erojen analysoimiseksi.

Mikäli rakkohaurun vapaana kasvavat ja kiinnittyneet muodot eroavat toisistaan myös muualla, on mahdollista, että rakkohaurun eri kasvumuodot voisivat tulevaisuudessa kehittyä omiksi lajeikseen. Lajiutuminen voi olla hyvinkin nopeaa, sillä aiemmin esimerkiksi itämeren- ja rakkohauru erkanivat eri lajeiksi vain noin neljänsadan vuoden kuluessa (Pereyra ym. 2009). Tarkkaa syytä näiden kahden lajin väliselle lajiutumiselle ei tiedetä, mutta Bergström ym. (2005) arvelivat että matalalla suolapitoisuudella olisi vaikutusta asiaan, sillä vaikka itämerenhauru voi lisääntyä seksuaalisesti jopa veden suolapitoisuuden ollessa vain 4

psu, hypo-osmoottinen stressi saattaa silti haitata lajien risteytymistä. Tämä saattaa myös selittää sen, ettei itämeren- ja rakkohaurun välillä ole havaittu risteytymistä (Bergström ym. 2005), vaikka lajiristeymien on todettu olevan yleisiä *Fucus*-suvussa (Powell (1963) Bergström ym. (2005) mukaan), mitä on epäilty yhdeksi syyksi suvussa esiintyvään runsaaseen morfologiseen vaihteluun (McLachlan ym. 1971). Toinen mahdollinen selitys itämerenaurun nopealle lajiutumiseen on aseksuaalinen lisääntyminen, joka Bergström ym. (2005) mukaan saattaa lisätä geneettistä ajautumista ja eristäytymistä, mikä puolestaan voi johtaa lajiutumiseen. Pereyra ym. (2009) pitävät mahdollisena, että lajit eriytyivät toisistaan koska itämerenauru sopeutui alhaisempaan suolapitoisuuteen, jossa rakkohauru ei pysty lisääntymään. Itämerenauru elää Itämeren pohjoisosissa, suolapitoisuudessa 3–5 (Bergström ym. 2005). Mikäli Pereyra ym. (2009) ovat oikeassa, vapaiden ja kiinnittyneiden rakkohaurun muotojen kehittyminen omiksi lajeikseen ei liene kovin todennäköistä, sillä ne kasvavat samoilla alueilla eikä niiden välillä ainakaan tämänhetkisen tiedon perusteella vallitse minkäänlaista lisääntymisestä.

#### **4.3. Muita tutkimuksessa ilmi tulleita asioita**

Tutkimuksessa havaittiin, että tutkitut rakkohaurupopulaatiot olivat sekä polymorfisia että polyploideja. Polymorfia on yleistä DNA-mikrosatelliiteilla (Jarne & Lagoda 1996), ja lähes kaikissa tutkimissani lokuksissa oli vähintään kaksi mahdollista alleelia vaihteluvälin ollessa 1–9 alleelia/lokus ja keskimääräisen lukumäärän 3,8 alleelia/lokus (liite 3). Polymorfian on myös havaittu olevan melko yleistä *Fucus*-suvun levillä (Candeias ym. 2015, Coyer ym. 2009). Candeias ym. (2015) tutkivat rakkohaurua löytääkseen polymorfisia geenimarkkereita sukulaisuus- ja populaatiogeneettisissä analyyseissä käytettäväksi. Aiemmin kehitetyt geenimarkkerit oli eristetty muista *Fucus*-suvun levistä, kuten kierreaurusta (Wallace ym. 2004) tai geenikirjastoista, joissa oli yksi tai useampi laji rakkohaurun lisäksi (esim. Engel ym. 2003), eivätkä ne olleet riittävän polymorfisia *Fucus*-suvun lajien sukulaisuussuhteiden tutkimista varten (Candeias ym. 2015).

Candeias ym. (2015) onnistuivat tutkimaan yhteensä yhdeksää polymorfista DNA-mikrosatelliittia. Candeias ym. (2015) aineistossa polymorfia oli runsaampaa kuin tässä työssä käytetyssä aineistossa, sillä keskimääräinen alleelien lukumäärä oli 8,7/lokus ja

vaihteluväli 5–18 mahdollista eri alleelia/lokus. Candeias ym. (2015) aineisto oli siis huomattavasti polymorfisempaa kuin tämä, vaikka tutkittuja yksilöitä oli heillä huomattavasti vähemmän. Candeias ym. (2015) kuitenkin analysoivat huomattavasti enemmän DNA-mikrosatelliitteja kuin tässä työssä. Vaikka Candeias ym. (2015) löysivät vain yhdeksän polymorfista markkeria, heillä oli alun perin analysoitavanaan 48 aluketta, ja yhteensä 14 (seitsemän Ranskasta ja seitsemän Portugalista) yksilöstä analysoitiin kaikki DNA-mikrosatelliitit. Havaitut yhdeksän polymorfista DNA-mikrosatelliittia otettiin mukaan tarkempiin analyyseihin, joissa käytettiin 44 Portugalista kerättyä rakkohauruysilöä. Siten kaikista Candeias ym. (2015) analysoimista markkereista vain 19 % oli polymorfisia, kun taas tässä työssä analysoiduista markkereista 100 % oli polymorfisia (liite 3). Candeias ym. (2015) analysoimissa polymorfisissa markkereissa oli kuitenkin keskimäärin enemmän alleeleja/lokus (8,7) kuin tässä työssä analysoiduissa markkereissa, joissa oli keskimäärin 3,7 alleelia/lokus.

Genotyypin tuloksia analysoitaessa havaittiin, että joissakin kromatogrammeissa näkyi kolme tai useampia piikkejä, mikä viittaa siihen että analysoidut yksilöt olivat polyploideja, eli niillä oli moninkertainen kromosomisto. Normaalisti rakkohauru on diploidi, eli sillä on kaksinkertainen kromosomisto. Polyploidiaan, moninkertaiseen kromosomistoon, viittaavia kolmea tai useampaa piikkiä esiintyi kuitenkin ainoastaan lokuksissa L38 ja Fsp2. Tulosta ei pidetty luotettavana, sillä ajateltiin, että polyploidia voitaisiin havaita kaikissa lokuksissa, mikäli tutkittava yksilö todella olisi polyploidi. Koska ei voitu olla varmoja, oliko polyploidia todellista vai mahdollisen tutkimusvirheen aiheuttama harha, lokukset L38 ja Fsp2 jätettiin pois myöhemmistä analyyseistä, jolloin analysoitavaksi jäi viisi lokusta. Myöhemmin kävi kuitenkin ilmi, että ainakin Coyer ym. (2006) olivat havainneet rakkohaurulla polyploidiaa. Coyer ym. (2006) tutkivat suolamarskeilla elämiseen sopeutuneita hauruja sekä niiden hybridisaatiota. He tutkivat Islannissa ja Irlannissa eläviä rakkohaurupopulaatioita ja käyttivät analyyseissään viittä DNA-mikrosatelliittia (L20, L38, L58, L85 ja B3) sekä mitokondrio-DNA:ta (mtDNA) joka periytyy äitilinjassa. Myös heidän tutkimuksessaan osalla tutkituista yksilöistä esiintyi polyploidiaa, joka oli havaittavissa vain osassa analysoiduista lokuksista. Jopa 68 % tutkituista irlantilaisista yksilöistä oli polyploideja, mutta polyploidiaa oli havaittavissa vain lokuksissa L20 ja L38. Sen sijaan Islannissa polyploidiaa ei havaittu, vaan tutkitut yksilöt olivat rakko- ja kierrehaurun (*F. spiralis*) risteytymiä. Koska sekä polyploidit

yksilöt että hybridit olivat sopeutuneet suolamarskeille, Coyer ym. (2006) päättelivät, että nimenomaan rakkohaurun geenit ovat oleellisia sopeuduttaessa ympäristöihin, joiden suolapitoisuus on vähäinen. Tämä näkyy myös siinä, että juuri rakkohauru on sopeutunut elämään murtovetisessä Itämeressä (Coyer ym. 2006).

#### **4.4. Johtopäätökset**

Tässä tutkimuksessa selvitettiin DNA-mikrosatelliittimarkkereiden avulla, eroavatko rakkohaurun kiinnittyneet ja vapaana kasvavat populaatiot toisistaan geneettisesti. Lisäksi selvitettiin, onko Suomen ja Ruotsin rakkohaurupopulaatioiden välillä geneettisiä eroja. Tutkimuksen tuloksena saatiin selville, että eri maiden rakkohaurukantojen välillä ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa, minkä perusteella voidaan päätellä, että etäisyydellä ei ole merkitystä rakkohaurun lisääntymiselle. Sen sijaan vapaana kasvavat ja kiinnittyneet populaatiot eroavat toisistaan tilastollisesti merkitsevästi. Tämä viittaa siihen, että vapaana kasvavat rakkohaurut pystyvät lisääntymään ainakin osittain itsenäisesti, eivätkä siis ole kiinnittyneistä populaatioista peräisin olevia ajelehtijoita.

Tämän tutkimuksen aineisto oli hyvin pieni, käytössä oli vain viisi DNA-mikrosatelliittia ja tutkittujen populaatioiden koko vaihteli välillä 2–20 yksilöä. Jatkotutkimukset suuremmalla näytekoollla ja useammilla DNA-mikrosatelliiteilla ovat tarpeen tulosten varmistamiseksi.



## **5. Kiitokset**

Suuri kiitos ohjaajilleni Jaanika Blomsterille ja Elina Leskiselälle kannustuksesta, neuvoista ja kärsivällisyydestä työn aikana, sekä ohjaajalleni Perttu Seppälle hänen korvaamattomasta avustaan gradutyön tilastovaiheen aikana. Ohjaajieni lisäksi haluan kiittää laboratoriokoordinaattori Kirsi Kähköstä, jota ilman en olisi selviytynyt laboratoriotyöstä. Kiitos myös kaikille muille FunkVeg-työryhmän jäsenille perehdyttämisestäni aiheeseen. Lopuksi kiitän Walter ja Andrée de Nottbeckin säätiötä työn rahoittamisesta.

## 6. Läheteet

- Aneer, G., Florell, G., Kautsky, U., Nellbring, S. & Sjöstedt, L. 1983: In-situ observations of Baltic herring (*Clupea harengus membras*) spawning behaviour in the Askö-Landsort area, northern Baltic proper - Marine Biology 74: 105-110
- Arnaud-Haond, S. & Belkhir, K. 2007: Program GenClone - ResearchGate <https://www.researchgate.net/publication/228571433> (9.5.2020)
- Balloux, F., Lehmann, L. & Meunier, T. de 2003: The Population Genetics of Clonal and Partially Clonal Diploids - Genetics 164: 1635-1644
- Bergström, L., Tatarenkov, A., Johannesson, K., Jönsson, R. B. & Kautsky, L. 2005: Genetic and morphological identification of *Fucus radicans* sp. nov. (Fucales, Phaeophyceae) in the brackish Baltic Sea - Journal of Phycology 41: 1025-1038
- Bäck, S. 1993: Morphological variation of northern Baltic *Fucus vesiculosus* along the exposure gradient - Annales Botanici fennici 30: 275-283
- Bäck, S., Collins, J. C. & Russel, C. 1991: Aspects of the reproductive biology of *Fucus vesiculosus* from the coast of SW Finland - Ophelia 34: 129-141
- Campbell, N. A., Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Winickoff, B. & Jackson, R. B. 2008: Biology, 8 p. - San Francisco, Calif: London: Benjamin Cummings; Pearson Education (distributor). 1418 s.
- Candeias, R., Casado-Amezúa, P., Pearson, G. A., Serrão, E. A. & Teixeira, S. 2015: Polymorphic microsatellite markers in the brown seaweed *Fucus vesiculosus* - BMC Research Notes 8: 73. DOI 10.1186/s13104-015-1035-x

- Corander J., Marttinen P., Sirén J. & Tang J. 2008: Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations - BMC Bioinformatics 9: 539. DOI 10.1186/1471-2105-9-539
- Coyer, J. A., Peters, A. F., Stam, W. T. & Olsen, J. L. 2003: Post-ice age recolonization and differentiation of *Fucus serratus* L. (Phaeophyceae; Fucaceae) populations in Northern Europe - Molecular Ecology 12: 1817–1829
- Coyer, J. A., Hoarau, G., Pearson, G. A., Serrão, E. A., Stam, W. T. & Olsen, J. L. 2006: Convergent adaptation to a marginal habitat by homoploid hybrids and polyploid ecads in the seaweed genus *Fucus* - Biology Letters 2: 405–408
- Coyer, J. A., Hoarau, G., Beszteri, B., Pearson, G. & Olsen, J. L. 2009: Expressed sequence tag-derived polymorphic SSR markers for *Fucus serratus* and amplification in other species of *Fucus* - Molecular Ecology Resources 9:168-170
- Dong, Z., Wang, H., Dong, Y., Wang, Y., Liu, W., Miao, G., Lin, X., Wang, D. & Liu, B. 2013: Extensive Microsatellite Variation in Rice Induced by Introgression from Wild Rice (*Zizania latifolia* Griseb.) - PLoS ONE 8 (4): e62317. doi: 10.1371/journal.pone.0062317
- Engel, C. R., Brawley, S. H., Edwards, K. J. & Serrão, E. 2003: Isolation and cross-species amplification of microsatellite loci from the fucoid seaweeds *Fucus vesiculosus*, *F. serratus* and *Ascophyllum nodosum* (Heterocontophyta, Fucaceae) - Molecular Ecology Notes 3: 180-182
- Eriksson, B. K., Johansson, G. & Snoeijs, P. 1998: Long-term changes in the sublittoral zonation of brown algae in the southern Bothnian Sea - European Journal of Phycology 33: 241-249

- Excoffier, L., Smouse, P. E. & Quattro, J. M. 1992: Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data - *Genetics*. 131: 479-91
- Francois, O. & Durand, E. 2010: Spatially explicit Bayesian clustering models in population genetics - *Molecular Ecology Resources* 10: 773-784
- Guo, S.W. & Thompson, E.A. 1992: Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles - *Biometrics* 48: 361-372
- HELCOM 2013. Climate change in the Baltic Sea Area: HELCOM thematic assessment in 2013. *Balt. Sea Environ. Proc* (No. 137). <https://www.helcom.fi/wp-content/uploads/2019/10/BSEP137.pdf> (7.5.2020)
- HELCOM Red List Macrophyte Expert Group 2013: HELCOM Red List: *Fucus vesiculosus* <http://www.helcom.fi/Red%20List%20Species%20Information%20Sheet/HELCOM%20Red%20List%20Fucus%20vesiculosus.pdf#search=fucus%20vesiculosus> (24.4.2017)
- Herman, B., Centonze Frohlich, V.E., Lakowicz, J.R., Murphy, D.B., Spring, K.R. & Davidson, M.W. 2015: Fluorescence Microscopy: Basic Concepts in Fluorescence <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html> (14.12.2017)
- Hoffman, J. I. & Amos, W. 2005: Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion - *Molecular Ecology* 14: 599–612
- Hällfors, G., Kangas, P. & Niemi, A. 1984: Recent changes in the phytal at the south coast of Finland - *Ophelia Supplementum* 3: 51-59
- Jarne, P. & Lagoda, P. J. L. 1996: Microsatellites, from molecules to populations and back - *Trends in Ecology & Evolution* 11: 424-429

- Jeffreys, A. J., & Pena, S. D. J. 1993: Brief introduction to human DNA fingerprinting - Teoksessa: Jeffreys, A. J., & Pena, S. D. J. (toim.) 1993: DNA fingerprinting: State of the science, 1-21. Berlin, Birkhäuser Verlag.
- Johannesson, K., Johannesson, D., Larsson, K. H., Huenchun, C. J., Perus, J., Forslund, H., Kautsky, L. & Pereyra, R. 2011: Frequent clonality in fucoids (*Fucus radicans* and *Fucus vesiculosus*; Fucales, Phaeophyceae) in the Baltic Sea - Journal of Phycology 47: 990-998
- Kangas, P. Autio, H., Hällfors, G. Luther, H., Niemi, A. & Salemaa, H. 1982: A general model of the decline of *Fucus vesiculosus* at Tvärminne, south coast of Finland in 1977-1981 - Acta Botanica Fennica 118: 1-27
- Kautsky, H., Kautsky, L., Kautsky, N., Kautsky, U. & Lindblad, C. 1992: Studies on the *Fucus vesiculosus* community in the Baltic Sea - Acta Phytogeographica Suecica 78: 33-48
- Kautsky, H., Kautsky, U. & Nellbring, S. 1988: Distribution of flora and fauna in an area receiving pulp mill effluents in the Baltic Sea - Ophelia 28: 139-155
- Keightley, P. D. & Otto, S. P. 2006: Interference among deleterious mutations favours sex and recombination in finite populations - Nature 443: 89-92
- Kiirikki, M. 1996: Experimental evidence that *Fucus vesiculosus* (Phaeophyta) controls filamentous algae by means of the whiplash effect - European Journal of Phycology 31: 61-66
- Kjellman, F. R. 1890: Handbok i Skandinaviens hafsalgflora. 1, Fucoideae. - Oscar L. Lamm. Stockholm. 103 s.

- Korbie, D. J. & Mattick, J. S. 2008: Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification - Nature Protocols 3: 1452-1456
- Larsson, U., Elmgren, R. & Wulff, F. 1985: Eutrophication of the Baltic Sea: causes and consequences - Ambio 14: 9-14
- Lass, H. U., & Matthäus, W. 1996: On temporal wind variations forcing salt water inflows into the Baltic Sea - Tellus A: Dynamic Meteorology and Oceanography 48: 663-671
- Lee, R. E. 1989: Phycology, 2 p. - Cambridge University Press. Cambridge, UK. 661 s.
- Long, J.C. 1986: The allelic correlation structure of Gainj- and Kalam-speaking people. i. the estimation and interpretation of Wright's F-statistics - Genetics 112: 629-647
- Lüning, K. 1990: Seaweeds: Their Environment, Biogeography, and Ecophysiology - John Wiley & Sons, Inc. Yhdysvallat. 527 s.
- Luther, H. 1981: Occurrence and ecological requirements of *Fucus vesiculosus* in semi-enclosed inlets of the Archipelago Sea, SW Finland. Botanici Fennici 18:187-200
- Macherey-Nagel 2014: Genomic DNA from plant: User manual
- Malm, T. & Kautsky, L. 2003: Differences in life-history characteristics are consistent with the vertical distribution pattern of *Fucus serratus* and *Fucus vesiculosus* (Fucales, Phaeophyceae) in the central Baltic Sea - Journal of Phycology 39: 880-887
- Matthäus, W., 1977: Zur säkularen Veränderlichkeit des Oberflächensalzgehaltes in der offenen Ostsee - Beiträge zur Meereskunde 39: 37-49
- Matthäus W., Nehring, D., Feistel, R., Nausch, G., Mohrholz, V. & Lass, H. U. 2008: The inflow of highly saline water into the Baltic Sea. Teoksessa: Feistel, R., Nausch, G., Wasmund (toim.): State and evolution of the Baltic Sea, 1952-2005 - a detailed 50-year

- survey of meteorology and climate, physics, chemistry, biology and marine environment. John Wiley and Sons: 265-309. Hoboken, NJ.
- McLachlan, L., Chen, C. M., Edelstein, T. 1971: The culture of four species of *Fucus* under laboratory conditions - *Canadian Journal of Botany* 49: 1463–1469
- Muhlin, J.F., Coleman, M.A, Rees, T.A.V. & Brawley, S.H. 2011: Modeling of reproduction in the intertidal macrophyte *Fucus vesiculosus* and implications for spatial subsidies in the nearshore environment - *Marine Ecology Progress Series* 140: 79-94
- Munsterhjelm, R. 1997: The aquatic macrophyte vegetation of flads and gloes, S coast of Finland - *Acta Botanica Fennica* 157: 1-68
- Nei, M. 1971: Interspecific Gene Differences and Evolutionary Time Estimated from Electrophoretic Data on Protein Identity - *The American Naturalist* 105: 385-398
- Nilsson, J., Engkvist, R. & Persson, L. 2004: Long-term decline and recent recovery of *Fucus* populations along the rocky shores of southeast Sweden, Baltic Sea - *Aquatic Ecology* 38: 587–598
- Norberg, Y. 1995: Morphological variation in the reduced, free floating *Fucus vesiculosus*, in the Baltic Proper - Department of Botany, Stockholm University, Stockholm.
- Norton, T. A., Mathieson, A. C. & Neushul, M. 1982: A Review of Some Aspects of Form and Function in Seaweeds - *Botanica Marina* 25: 501-510
- Olsen, J. B, Miller, S. J., Spearman, W. J. & John K. Wenburg, J. K. 2004: Patterns of Genetic Diversity in Alaskan Coho Salmon - NPAFC Technical Report No. 5
- Peakall, R. & Smouse, P. 2006: GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295

- Peakall, R. & Smouse, P. 2012: GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update - *Bioinformatics* 28: 2537-2539
- Pereyra, R. T., Bergström, L., Kautsky, L. & Johannesson, K. 2009: Rapid speciation in a newly opened postglacial marine environment, the Baltic Sea - *BMC Evolutionary Biology* 9 (70). DOI: 10.1186/1471-2148-9-70
- Perrin, C., Daguin, C., Van De Vliet, M., Engel, C.R., Pearson, G.R. & Serrão, E.A. 2007: Implications of mating system for genetic diversity of sister algal species: *Fucus spiralis* and *Fucus vesiculosus* (Heterokontophyta, Phaeophyceae) - *European Journal of Phycology* 42 (3): 219-230
- Powell, H.T. 1963: Speciation in the genus *Fucus* L. and related genera - *Speciation in the Sea*, Systematics Association Publications 5: 63-77
- Prescott, L. M., Harley, J. P. & Klein, D. A. 2002: *Microbiology*, 5 p. - McGraw-Hill. New York. 1135 s.
- Raymond M. & Rousset F. 1995: GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism - *Journal of Heredity* 86: 248-249
- Rikkinen, J. 1999: Leviä, sieniä ja leväsieniä: johdatus levien ja sienten monimuotoisuuteen - *Yliopistopaino*. Helsinki. 194 s.
- Rousset, F. 2008: Genepop'007: a complete re-implementation of the Genepop software for Windows and Linux - *Molecular Ecology Resources* 8: 103-106
- Ruuskanen, A. 2016: Makrolevien esiintyminen ja seuranta Uudenmaan rannikkovesillä. Valtakunnallisen makrofyttiseurannan kuvaus ja toteutus Uudellamaalla 1993–2016 - Raportteja 100/2016, Elinkeino-, liikenne- ja ympäristökeskus. <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-314-526-9> (8.5.2020)



- Ruuskanen, A., Bäck, S. & Reitalu, T. 1999: A comparison of two cartographic exposure methods using *Fucus vesiculosus* as an indicator - *Marine Biology* 134: 139–145
- Sandén, P. & Håkansson, B. 1996: Long-term trends in Secchi depth in the Baltic Sea - *Limnological Oceanography* 41: 346-351
- Schagerström, Ellen, videoneuvottelu, 20.2.2017
- Svedelius, N. 1901: Studier över Östersjöns hafsalgflora. Akademisk avhandling, Uppsala universitet. 84 s.
- Takolander, A., Leskinen, E. & Cabeza, M. 2017: Synergistic effects of extreme temperature and low salinity on foundational macroalga *Fucus vesiculosus* in the northern Baltic Sea - *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 495: 110–118
- Tatarenkov, A., Bergström, L., Jönsson, R. B., Serrão, E. A., Kautsky, L. & Johannesson, K. 2005: Intriguing asexual life in marginal populations of the brown seaweed *Fucus vesiculosus* - *Molecular Ecology* 14: 647–651
- Tautz, D. 1993: Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences - Teoksessa: Jeffreys, A. J., & Pena, S. D. J. (toim.) 1993: DNA fingerprinting: State of the science, 1-21. Berlin, Birkhäuser Verlag.
- Tirri, R., Lehtonen, J., Lemmetyinen, R., Pihakaski, S. & Portin, P. 2001: Biologian sanakirja, 3 p. - Kustannusosakeyhtiö Otava. Helsinki. 888 s.
- Torn, K., Krause-Jensen, D. & Martin, G. 2006: Present and past depth distribution of bladderwrack (*Fucus vesiculosus*) in the Baltic Sea - *Aquatic Botany* 84: 53–62
- Tóth, G., Gáspári, Z. & Jurka, J. 2000: Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis - *Genome Research* 10: 967–981

- Vogt, H. & Schramm, W. 1991: Conspicuous decline of *Fucus* in Kiel Bay (western Baltic): what are the causes? - Marine Ecology Progress Series 69: 189-194
- Waern, M. 1952: Rocky-shore algae in the Öregrund archipelago - Acta Phytogeographica Suecica 30: 298 s.
- Wallace A. L., Klein, A. S. & Mathieson, A. C. 2004: Determining the affinities of salt marsh fucoids using microsatellite markers: evidence of hybridization and introgression between two species of *Fucus* (Phaeophyta) in a Maine estuary - Journal of Phycology 40: 1013–1027
- Weber, J. L. 1990: Informativeness of Human (dC-dA)<sub>n</sub> \* (dG-dT)<sub>n</sub> Polymorphisms - Genomics 7: 524-530
- Webster, M. S., & Reichart, L. 2005: Use of Microsatellites for Parentage and Kinship Analyses in Animals - Methods in Enzymology 395: 222-238
- Wright, S. 1965: The Interpretation of Population Structure by F-Statistics with Special Regard to Systems of Mating - Evolution 19: 395-420

## **7. Liitteet**

Liite 1: PCR-liuoksen optimointi

Liite 2. Yleistietoa populaatioista

Liite 3. Alleelien määrä lokuksittain

Liite 4. Locus- ja populaatiokohtaiset P-arvot Hardy-Weinbergin analyysissä

## Liite 1: PCR-liuoksen optimointi

Aluksi käytettiin seuraavaa PCR-liuosta:

- 5 µl 2x Phusion Flash PCR Master Mix
- 1 µl R-aluketta
- 1 µl F-aluketta
- 1 µl näyte-DNA:ta
- 2 µl mq-vettä
- yhteensä 10 µl

Huomattiin, että oli hankalaa saada PCR-tuotetta näkyviin geelielektroforeesissa. Arveltiin, että Phusion Flash -mastermix ei sovi alukkeille, mahdollisesti siksi, että se vaatii käynnistyslämpötilan 98 °C, jota pidettiin liian korkeana. Mastermixiksi vaihdettiin sen vuoksi One Taq Hot Start, joka vaatii käynnistyslämpötilan 95 °C. PCR-liuokseen lisättiin myös BSA:ta (bovine albumin serum), jota käytetään sitomaan monistusta mahdollisesti häiritseviä yhdisteitä, kuten DNA:ssa mahdollisesti olevia polyfenoleja.

Lopullinen PCR-liuos:

- 6,25 µl One Taq Hot Start-mastermix
- 0,5-1 µl R-aluketta (0,5/3-0,6 µl jokaista aluketta riippuen siitä, montako aluketta tuli samaan ohjelmaan (1-3) ja mitä alukkeita ne olivat (joitakin tarvittiin enemmän))
- 0,5-1 µl F-aluketta (0,5/3-0,6 µl jokaista aluketta riippuen siitä, montako aluketta tuli samaan ohjelmaan (1-3) ja mitä alukkeita ne olivat (joitakin tarvittiin enemmän))
- 0,5 µl DNA:ta
- 2,5 µl BSA:ta (0,2 µg/µl)
- 1,25–2,25 µl mqH<sub>2</sub>O
- yhteensä 12,5 µl PCR-liuosta

## PCR-optimointi alukkeittain

PCR:ssä käytetyt alukkeet eivät kuuluneet DNA-eristyskittiin vaan ne oli tilattu erikseen Taq Copenhagen A/S -yrityksestä Kööpenhaminasta. Alukkeet, samoin kuin niistä myöhemmin tehdyt laimennokset (1:10), säilytettiin pakastimessa (-20 °C), ja sulatettiin tarvittaessa. PCR:ssä käytettyjä alukkeita oli yhdeksän ja ne olivat: Fsp1, Fsp2, Fsp3, Fsp4, L20, L38, L58, L85 ja L94. Alukkeet on kuvattu tarkemmin pro gradu -työn taulukossa kolme.

### Fsp1

Ensimmäinen Fsp1:lle kokeiltu PCR-sykli oli samankaltainen kuin se, jota Perrin ym. (2007) käyttivät. Sykliä oli kuitenkin muokattu, ja lämpötila 98 °C oli korkeampi kuin alkuperäisessä työssä käytetty 94 °C (Perrin ym. 2007). Syynä tähän oli käytetty Phusion Flash -mastermix, joka vaati korkean käynnistyslämpötilan.

Fsp1 R & F:

- Vaihe 1
  - 98 °C 30 s
- Vaihe 2 (40 x)
  - 98 °C 30 s
  - 55 °C 40 s
  - 72 °C 30 s
- 20 °C ∞

Kokeiltaessa alukkeita Fsp1 ja Fsp4 havaittiin, että negatiivisessa kontrollissa erottui monistustuotteita. Kaikki alukkeet päätettiin testata siltä varalta, että ne olisivat kontaminoituneita, ja samalla kokeiltiin, voitaisiinko kaikille alukkeille käyttää samaa PCR-sykliä. Kolme aluketta (L20, L58, Fsp 1) monistui siististi, mutta muille alukkeille monistui ei-haluttuja tuotteita (epäspesifi monistuminen). Myös muita mahdollisia syklejä kokeiltiin, ja huomattiin, että Phusion Flash -mastermixia käytettäessä DNA:ta oli liikaa eivätkä Fsp1:n ABI-tulokset olleet luettavissa, vaikka näytteet erottuisivat geelielektroforeesissa heikosti tai

eivät ollenkaan. Lopullisessa PCR:ssa alukkeet L38\_Fsp1\_Fsp3 yhdistettiin samaan PCR-paneeliin. Mastermix oli One Taq Hot Start ja PCR-sykli Perrin ym. (2007) käyttämä sykli:

- Vaihe 1
  - 95 °C 5 min
- Vaihe 2 (40 x)
  - 94 °C 30 s
  - 55 °C 40 s
  - 72 °C 30 s
- Vaihe 3:
  - 72 °C 5 min
  - 20 °C ∞

## **Fsp2**

Kaikki alukkeet testattiin siltä varalta, että ne olisivat kontaminoituneita, ja samalla kokeiltiin, voitaisiinko kaikille alukkeille käyttää samaa PCR-sykliä. Kolme aluketta (L20, L58, Fsp 1) monistui siististi, mutta muille alukkeille, myös Fsp2:lle, monistui ei-haluttuja tuotteita (epäspesifi monistuminen). Käytetty sykli oli:

- Vaihe 1:
  - 98 °C 5 min
- Vaihe 2 (38x):
  - 98 °C 5 s
  - 58 °C 30 s
  - 72 °C 30 s
- Vaihe 3:
  - 72 °C 1 min
  - 20 °C ∞

Alukkeelle Fsp2 kokeiltiin monia eri PCR-syklejä, ja yritettiin myös yhdistää se samaan paneeliin alukkeen L58 kanssa. Tulokset olivat kuitenkin huonoja, ja Fsp2 jouduttiin lopulta laittamaan PCR:ään yksinään. Lopullinen sykli alukkeelle Fsp2 oli:

- Vaihe 1
  - 95 °C 5 min
- Vaihe 2 (35 x)
  - 94 °C 30 s
  - 55 °C 40 s
  - 72 °C 30 s
- Vaihe 3:
  - 72 °C 5 min
  - 20 °C ∞

### **Fsp3**

Kaikki alukkeet testattiin siltä varalta, että ne olisivat kontaminoituneita, ja samalla kokeiltiin, voitaisiinko kaikille alukkeille käyttää samaa PCR-sykliä. Kuten alukkeelle Fsp2, myös Fsp3:lle monistui tarpeettomia monistustuotteita (epäspesifi monistuminen). Käytetty sykli oli:

- Vaihe 1:
  - 98 °C 5 min
- Vaihe 2 (38x):
  - 98 °C 5 s
  - 58 °C 30 s
  - 72 °C 30 s
- Vaihe 3:
  - 72 °C 1 min
  - 20 °C ∞

Alukkeelle Fsp3 kokeiltiin monia eri PCR-syklejä, ja koetettiin yhdistää se samaan paneeliin alukkeiden L20 ja L58 kanssa. Tulokset olivat kuitenkin huonoja, ja Fsp3 yhdistettiin lopulta PCR:ssä samaan paneeliin alukkeiden L38 ja Fsp1 kanssa. Tällä kertaa tulokset olivat erittäin selkeitä, ja lopullinen PCR-sykli paneelille L38\_Fsp1\_Fs3 oli:

- Vaihe 1:
  - 95 °C 5 min
- Vaihe 2 (40x):
  - 94 °C 30 s
  - 55 °C 30 s
  - 72 °C 30 s
- Vaihe 3:
  - 72 °C 5 min
  - 4 °C ∞

#### **Fsp4**

PCR-ohjelmaa testattiin ensimmäiseksi alukkeille L85 ja Fsp4. Käytettiin kolmea eri laimennosta: 1:1, 1:10, 1:20. Käytetty PCR-sykli oli:

- Vaihe 1
  - 98 °C 1 min
- Vaihe 2 (34 x)
  - 98 °C 1 s
  - 60 °C 15 s
  - 72 °C 20 s
- Vaihe 3
  - 72 °C 1 min
  - 20 °C ∞

Osa PCR-tuotteista erottui geelielektroforeesissa voimakkaimmin laimennettuina, osa laimentamattomina. Myöhemmin käytettiin aina laimennosta 1:10, jota pidettiin hyvänä



kompromissina. Alukkeelle Fsp4 kokeiltiin monia eri PCR-syklejä sekä alkuperäisen Phusion Flash -mastermixin lisäksi myös QiaGen- ja One Taq Hot Start -mastermixeja. Tämän alukkeen ABI-tulokset olivat kuitenkin lukukelvottomia, joten päätettiin, ettei sitä käytetä tutkimuksessa.

## L20

Kaikki alukkeet testattiin siltä varalta, että ne olisivat kontaminoituneita, ja samalla kokeiltiin, voitaisiinko kaikille alukkeille käyttää samaa PCR-sykliä. L20 oli yksi kolmesta alukkeesta, jotka monistuivat siististi (muut olivat L58 ja Fsp1), mutta muille alukkeille monistui sellaistaikin, jota ei tarvita (epäspesifi monistuminen). Käytetty sykli oli:

- Vaihe 1:
  - 98 °C 5 min
- Vaihe 2 (38x):
  - 98 °C 5 s
  - 58 °C 30 s
  - 72 °C 30 s
- Vaihe 3:
  - 72 °C 1 min
  - 20 °C ∞

L20-alukkeelle kokeiltiin monia erilaisia PCR-syklejä, ja lopulta se koetettiin yhdistää paneeliin alukkeiden L58 ja Fsp3 kanssa. Tuloksia oli kuitenkin hankala lukea, ja lopulta L20 jouduttiin laittamaan yksinään PCR:ään, vaikka sen saattoikin yhdistää ABI:iin alukkeiden L85 ja L94 kanssa. Lopullinen käytetty PCR-sykli alukkeelle L20 oli:

- Vaihe 1:
  - 95 °C 5 min
- Vaihe 2 (5x):
  - 95 °C 30 s
  - 60–55 °C, touchdown 1 °C/sykli, 30 s

- 72 °C 30 s
- Vaihe 3 (35x):
  - 95 °C 30 s
  - 55 °C 30 s
  - 72 °C 30 s
- Vaihe 4:
  - 72 °C 5 min
  - 4 °C ∞

### **L38**

Päätettiin testata kaikki alukkeet siltä varalta, että ne olisivat kontaminoituneita, ja samalla kokeiltiin, voitaisiinko kaikille alukkeille käyttää samaa PCR-sykliä. Kolme aluketta (L20, L58, Fsp 1) monistui siististi, mutta muille alukkeille, myös L38:lle, monistui sellaistaikin, jota ei tarvita (epäspesifi monistuminen). Käytetty sykli oli:

- Vaihe 1:
  - 98 °C 5 min
- Vaihe 2 (38x):
  - 98 °C 5 s
  - 58 °C 30 s
  - 72 °C 30 s
- Vaihe 3:
  - 72 °C 1 min
  - 20 °C ∞

L38-alukkeelle kokeiltiin useita eri PCR-syklejä ja kolmea eri mastermixia: Phusion Flash, Qiaagen ja lopulta One Taq. L38 Kokeiltiin myös yhdistää alukkeet L38 ja L94 samaan paneeliin. Se ei kuitenkaan onnistunut, vaan L38 yhdistettiin lopulta paneeliin alukkeiden Fsp1 ja Fsp3 kanssa. Lopullinen sykli oli:

- Vaihe 1:
  - 95 °C 5 min
- Vaihe 2 (40x):
  - 94 °C 30 s
  - 55 °C 30 s
  - 72 °C 30 s
- Vaihe 3:
  - 72 °C 5 min
  - 4 °C ∞

## L58

Päätettiin testata kaikki alukkeet siltä varalta, että ne olisivat kontaminoituneita, ja samalla kokeiltiin, voitaisiinko kaikille alukkeille käyttää samaa PCR-sykliä. L20, L58 ja Fsp1 monistuivat siististi, mutta muille alukkeille monistui sellaistaikin, jota ei tarvita (epäspesifi monistuminen). Käytetty sykli oli:

- Vaihe 1:
  - 98 °C 5 min
- Vaihe 2 (38x):
  - 98 °C 5 s
  - 58 °C 30 s
  - 72 °C 30 s
- Vaihe 3:
  - 72 °C 1 min
  - 20 °C ∞

L58 kokeiltiin useita erilaisia PCR-syklejä, ja se koetettiin ensin yhdistää samaan paneeliin alukkeiden L20 ja Fsp3 kanssa. Tulokset olivat kuitenkin huonoja, ja seuraavaksi L58 ja Fsp2 koetettiin yhdistää samaan paneeliin. Fsp2 oli valitettavasti hankala lukea, ja lopulta L58 jouduttiin laittamaan PCR:ään erikseen. Lopullinen sykli oli:

- Vaihe 1:
  - 95 °C 5 min
- Vaihe 2 (35x):
  - 94 °C 30 s
  - 52 °C 40 s
  - 72 °C 30 s
- Vaihe 3:
  - 72 °C 5 min
  - 20 °C ∞

## L85

PCR-ohjelmaa testattiin ensimmäiseksi alukkeille L85 ja Fsp4. Käytettiin kolmea eri laimennosta: 1:1, 1:10, 1:20. Käytetty PCR-sykli oli:

- Vaihe 1
  - 98 °C 1 min
- Vaihe 2 (34 x)
  - 98 °C 1 s
  - 60 °C 15 s
  - 72 °C 20 s
- Vaihe 3
  - 72 °C 1 min
  - 20 °C ∞

L85-alukkeelle kokeiltiin useita mahdollisia PCR-syklejä. Se koetettiin yhdistää samaan PCR-paneeliin alukkeiden L20 ja L94 kanssa. Kävi ilmi, että alukkeet L85 ja L94 voidaan tosiaan yhdistää PCR:ään, mutta L20 joudutaan laittamaan erikseen. Lopullinen sykli oli:

- Vaihe 1:
  - 95 °C 5 min
- Vaihe 2 (5x):

- 95 °C 30 s
- 60–55 °C, touchdown 1 °C/sykli, 30 s
- 72 °C 30 s
- Vaihe 3 (35x):
  - 95 °C 30 s
  - 55 °C 30 s
  - 72 °C 30 s
- Vaihe 4:
  - 72 °C 5 min
  - 4 °C ∞

## L94

Päätettiin testata kaikki alukkeet siltä varalta, että ne olisivat kontaminoituneita, ja samalla kokeiltiin, voisiko kaikkia alukkeita monistaa samalla PCR-syklillä. Kolme aluketta (L20, L58, Fsp 1) monistui siististi, mutta muille alukkeille, myös L94:lle, monistui sellaistaakin, jota ei tarvita (epäspesifi monistuminen). Käytetty sykli oli:

- Vaihe 1:
  - 98 °C 5 min
- Vaihe 2 (38x):
  - 98 °C 5 s
  - 58 °C 30 s
  - 72 °C 30 s
- Vaihe 3:
  - 72 °C 1 min
  - 20 °C ∞

Kokeiltiin monia eri PCR-syklejä alukkeelle L94, samoin kuin kolmea eri mastermixia: Phusion Flash, Qiaagen ja lopuksi One Taq. L94 koetettiin yhdistää paneeliin yhdessä alukkeen L38 kanssa. Tämä ei kuitenkaan tuottanut hyviä tuloksia, kuten ei myöskään paneeli

L20\_L85\_L94, sillä L20 oli erittäin hankala lukea. L94 pystytettiin kuitenkin yhdistämään samaan paneeliin alukkeen L85 kanssa. Lopullinen PCR-sykli paneelille L85\_L94 oli:

- Vaihe 1:
  - 95 °C 5 min
- Vaihe 2 (5x):
  - 95 °C 30 s
  - 60–55 °C, touchdown 1 °C/sykli, 30 s
  - 72 °C 30 s
- Vaihe 3 (35x):
  - 95 °C 30 s
  - 55 °C 30 s
  - 72 °C 30 s
- Vaihe 4:
  - 72 °C 5 min
  - 4 °C ∞

## Liite 2. Yleistietoa populaatioista

Yleistietoa populaatioista. Taulukkoon on kuvattu jokaisen populaation yksilömäärä (N), alleelien lukumäärä lokuksittain (Na/lokus), alleelien määrä populaatiossa (Na/populaatio), odotettu heterotsygotia lokuksittain (He/lokus) ja havaittu heterotsygotia lokuksittain (Ho/lokus). Alleelien lukumäärää (Na) populaatiossa ei voi suoraan laskea alleelien määrästä lokuksissa, sillä useammassa eri lokuksessa saattaa esiintyä sama alleeli. Lisäksi jokaisen populaation alleelien määrälle sekä odotetulle ja havaitulle heterotsygotialle on laskettu keskiarvo (Ka).

Pop (N)	Lokus	Na/Lokus	Na/Pop	Ka/Na	He/Lokus	Ka/He	Ho/Lokus	Ka/Ho
hA1	L20	6	22	4,8	0,638	0,576	0,647	0,618
(17)	L58	3			0,531		0,625	
	L85	4			0,663		0,647	
	L94	2			0,264		0,313	
	Fsp1	9			0,783		0,857	
hA2	L20	7	22	4,6	0,649	0,564	0,500	0,540
(20)	L58	4			0,668		0,813	
	L85	4			0,645		0,556	
	L94	3			0,156		0,167	
	Fsp1	5			0,704		0,667	
hA3	L20	6	20	4,2	0,644	0,514	0,471	0,486
(19)	L58	4			0,452		0,357	
	L85	4			0,569		0,526	
	L94	2			0,229		0,263	
	Fsp1	5			0,678		0,813	
hH1	L20	4	19	4,2	0,472	0,508	0,500	0,526
(18)	L58	4			0,580		0,625	
	L85	5			0,691		0,833	

	L94	3			0,106		0,111	
	Fsp1	5			0,691		0,563	
hH2	L20	5	19	4,0	0,510	0,473	0,500	0,469
(17)	L58	4			0,457		0,429	
	L85	4			0,619		0,688	
	L94	2			0,061		0,063	
	Fsp1	5			0,718		0,667	
hH3	L20	4	17	4,0	0,601	0,585	0,692	0,645
(18)	L58	4			0,613		0,813	
	L85	4			0,627		0,611	
	L94	3			0,397		0,389	
	Fsp1	5			0,687		0,722	
hT1	L20	3	9	2,8	0,611	0,567	1,000	0,800
(3)	L58	2			0,444		0,667	
	L85	3			0,611		1,000	
	L94	2			0,500		0,333	
	Fsp1	4			0,667		1,000	
hT2	L20	3	16	3,2	0,500	0,589	0,667	0,733
(3)	L58	3			0,611		1,000	
	L85	4			0,722		1,000	
	L94	2			0,444		0,000	
	Fsp1	4			0,667		1,000	
hT3	L20	4	16	3,2	0,722	0,498	0,667	0,567



(4)	L58	3			0,406		0,500	
	L85	3			0,611		0,667	
	L94	1			0,000		0,000	
	Fsp1	5			0,750		1,000	
H1	L20	5	18	3,8	0,712	0,514	0,667	0,518
(13)	L58	3			0,351		0,333	
	L85	4			0,665		0,636	
	L94	3			0,210		0,077	
	Fsp1	4			0,633		0,875	
H2	L20	4	17	3,6	0,620	0,514	0,933	0,632
(16)	L58	4			0,408		0,500	
	L85	4			0,702		0,786	
	L94	2			0,497		0,643	
	Fsp1	4			0,345		0,300	
H3	L20	5	22	4,4	0,737	0,609	0,857	0,597
(19)	L58	5			0,647		0,706	
	L85	4			0,483		0,500	
	L94	2			0,444		0,000	
	Fsp1	6			0,731		0,923	
OB	L20	2	10	2	0,375	0,475	0,500	0,700
(2)	L58	2			0,500		1,000	
	L85	2			0,500		0,000	
	L94	2			0,500		1,000	
	Fsp1	2			0,500		1,000	

<b>Kaikki</b>	<b>17,5</b>	<b>3,8</b>	<b>0,537</b>	<b>0,602</b>
---------------	-------------	------------	--------------	--------------

### Liite 3. Alleelien lukumäärä lokuksittain

Alleelien lukumäärä lokuksittain. Taulukkoon on kuvattu jokaisen lokuksen alleelien lukumäärä kussakin populaatiossa sekä niiden keskiarvo (Ka.).

Populaatio/Lokus	L20	L58	L85	L94	Fsp1	Kaikki
hA1	6	3	4	2	9	
hA2	7	4	4	3	5	
hA3	6	4	4	2	5	
hH1	4	4	5	3	5	
hH2	5	4	4	2	5	
hH3	4	4	4	3	5	
hT1	3	2	3	2	4	
hT2	3	3	4	2	4	
hT3	4	3	3	1	5	
H1	5	3	4	3	4	
H2	4	4	4	2	4	
H3	5	5	4	2	6	
OB	2	2	2	2	2	
<b>Ka.</b>	<b>4,5</b>	<b>3,5</b>	<b>3,8</b>	<b>2,2</b>	<b>4,8</b>	<b>3,8</b>

#### Liite 4. Locus- ja populaatiokohtaiset P-arvot Hardy-Weinbergin analyysissä

Locus- ja populaatiokohtaiset P-arvot Hardy-Weinbergin analyysissä. P-arvon merkitsevyyden rajaksi asetettiin 0,01. Mikäli P-arvo oli tätä matalampi, katsottiin, ettei kyseessä oleva locus ollut HW-tasapainossa. Nämä arvot on korostettu.

Pop.	P-arvo / Locus						
	L20	L38	L58	L85	L94	Fsp1	Fsp3
<b>hA1</b>	0,9486	0,7297	0,7032	0,5737	1,0000	0,3744	0,0034
<b>hA2</b>	0,0148	0,2139	0,0339	0,0451	1,0000	0,6027	0,0005
<b>hA3</b>	0,0939	0,5342	0,1491	0,7293	0,3916	0,9619	0,0005
<b>hH1</b>	0,4060	0,2257	0,3616	0,9130	1,0000	0,3913	<0,0001
<b>hH2</b>	0,6114	0,0022	0,2451	0,9420	x	0,7117	0,0059
<b>hH3</b>	0,6041	0,0743	0,6522	0,5472	1,0000	0,9063	<0,0001
<b>hT1</b>	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,3330
<b>hT2</b>	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,1967	1,0000	0,0642
<b>hT3</b>	0,4643	0,3111	1,0000	1,0000	x	1,0000	0,4384
<b>H1</b>	0,0945	0,1164	0,2933	0,1876	x	0,2605	0,1048
<b>H2</b>	0,0442	0,6271	1,0000	0,0063	1,0000	0,4525	0,0010
<b>H3</b>	0,0248	0,6770	0,8530	0,7420	0,0001	0,0003	<0,0001
<b>OB</b>	x	x	x	0,3353	1,0000	x	x